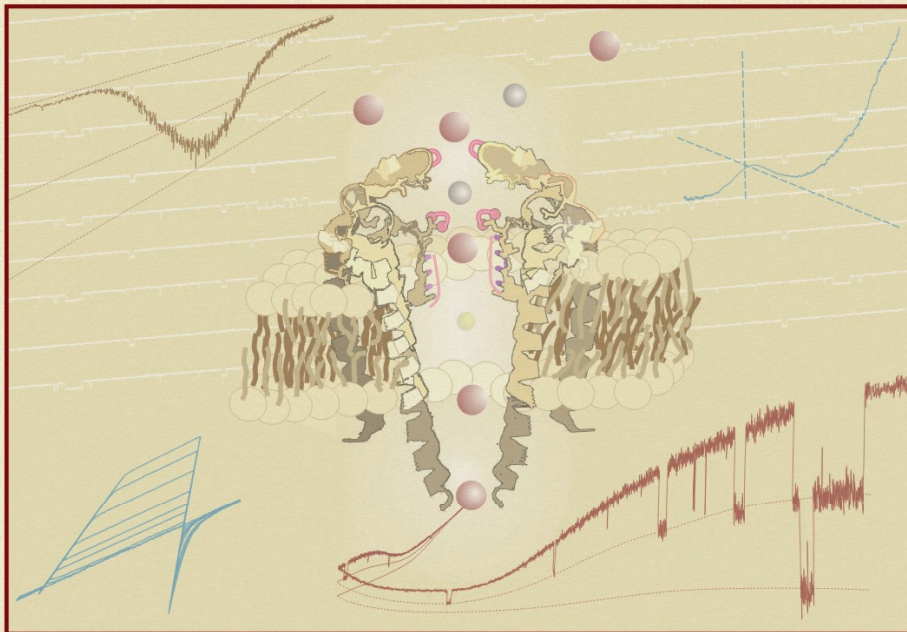


Marcus Semtner

---

**Elektrophysiologische Charakterisierung  
des klassischen TRP-Kanals  
TRPC5**

---



Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# Elektrophysiologische Charakterisierung des klassischen TRP-Kanals TRPC5

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Marcus Semtner**  
aus Sangerhausen

Marburg/Lahn 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
09.12.2010.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Tim D. Plant

Koreferent: Prof. Dr. Dominik Oliver

Gewidmet  
meinem Opa und Freund  
Adolf Semtner

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Ca <sup>2+</sup> - abhängige Signalwege.....	1
1.1.1. Hauptelemente der Ca <sup>2+</sup> -Homöostase.....	1
1.1.2. PLC-abhängige Ca <sup>2+</sup> -Signalwege.....	2
1.2. Die Familie der TRP-Ionenkanäle .....	3
1.2.1. Die klassischen TRP-Kanäle (TRPC) .....	4
1.2.2. Die Vanilloid-Familie der TRP-Kanäle (TRPV) .....	9
1.2.3. Die Subfamilie der TRPM-Kanäle.....	10
1.2.4. TRPA1 .....	11
1.3. Biophysikalische Charakteristika von TRP-Kanälen .....	11
1.3.1. Die Spannungsabhängigkeit von TRP-Kanälen .....	11
1.3.2. Effekt von extrazellulären Kationen auf Ströme durch TRP-Kanäle .....	13
1.3.3. Determinanten der Ionenpermeation durch TRP-Kanäle .....	14
1.4. Zielsetzung der Doktorarbeit .....	18
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1. Molekularbiologie .....	19
2.1.1. Lösungen und Enzyme .....	19
2.1.1.1. Bakterienanzucht.....	19
2.1.1.2. DNA-Präparation .....	20
2.1.1.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.1.2. Plasmide und cDNAs .....	21
2.1.3. Qualitätskontrollen der DNA .....	21
2.1.3.1. DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen .....	21
2.1.3.2. DNA-Sequenzierung.....	22
2.1.4. Plasmidamplifikation .....	22
2.1.4.1. Transformation .....	22
2.1.4.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	23
2.1.4.3. Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	23
2.1.5. Einführung von Punktmutationen.....	24
2.1.6. Molekulare Klonierung .....	25
2.1.6.1. Präparativer DNA-Verdau.....	25
2.1.6.2. Gelelution .....	26
2.1.6.3. Ligation .....	27
2.1.7. Übersicht über die Herstellung der verwendeten Plasmide.....	27
2.2. Zellkultur und Transfektionen.....	28
2.2.1. Zellkultur von HEK293-Zellen .....	28
2.2.2. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA.....	28
2.2.3. Vorbereitung der Zellen für die Experimente .....	29
2.3. Konfokale Mikroskopie .....	29

2.4. Elektrophysiologie .....	30
2.4.1. Die Patch-Clamp-Technik .....	30
2.4.1.1. Konfigurationen .....	30
2.4.1.2. Der Patch-Clamp-Stromkreis.....	32
2.4.1.3. Potentiale zwischen Pipetten- und Badelektrode .....	32
2.4.2. Ionenkanäle: Theoretische Grundlagen.....	34
2.4.2.1. Permeation von Ionen durch Kanäle .....	34
2.4.2.2. Die Eisenman-Theorie.....	37
2.4.2.3. Die Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen .....	38
2.4.3. Aufnahmebedingungen der Patch-Clamp-Experimente .....	39
2.4.4. Lösungen .....	40
2.4.4.1. Standard-Extrazellulärlösung und Standard-Intrazellulärlösung .....	41
2.4.4.2. Weitere Lösungen .....	41
2.4.5. Datenanalyse und Statistik .....	44
2.4.5.1. Auswertung von Ganzzellströmen.....	44
2.4.5.2. Einzelkanalanalyse.....	45
2.5. Molekulare Modelle .....	47
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1. Ströme durch TRPC5.....	48
3.1.1. Ganzzell-Ströme durch TRPC5 .....	48
3.1.2. Einzelkanalströme durch TRPC5.....	49
3.2. Die Spannungsabhängigkeit der TRPC-Kanäle.....	51
3.2.1. Spannungsabhängige Komponenten der Ströme durch TRPC5.....	51
3.2.2. Wie ändert sich Spannungsabhängigkeit von TRPC5 während seiner PLC-vermittelten Aktivierung? .....	54
3.2.3. Die Spannungsabhängigkeit anderer Kanäle aus der TRPC-Familie ....	58
3.2.3.1. TRPC4 .....	58
3.2.3.2. TRPC3 und TRPC6 .....	60
3.3. Potenzierung von TRPC5 durch H <sup>+</sup> .....	62
3.3.1. Sequenzvergleich der Porenregion verschiedener TRP-Kanäle .....	62
3.3.2. Extrazelluläre H <sup>+</sup> potenzieren Ganzzell-Ströme durch TRPC5.....	63
3.3.2.1. PLC-abhängig aktivierte Ströme durch TRPC5.....	63
3.3.2.2. Basale Ströme durch TRPC5 .....	66
3.3.3. Einzelkanaluntersuchung der H <sup>+</sup> -Potenzierung von TRPC5-wt.....	67
3.3.4. Molekulare Komponenten der Effekte von H <sup>+</sup> auf TRPC5.....	69
3.3.4.1. Potenzierung der PLC-abhängig aktivierten Ströme .....	69
3.3.4.2. Potenzierung der basalen Ströme .....	72
3.3.5. Effekt extrazellulärer H <sup>+</sup> auf andere TRPC-Kanäle.....	77
3.4. Ionenpermeation durch TRPC5 .....	78
3.4.1. Experimente zum Umkehrpotential.....	78
3.4.2. Mögliche Determinanten der Ionenpermeation durch TRPC5.....	86
3.4.2.1. Mutationen in der Porenregion von TRPC5 .....	86
3.4.2.2. I-V-Beziehungen der Porenmutanten von TRPC5 .....	88

3.4.3. Permeation divalenter Kationen durch TRPC5.....	90
3.4.3.1. Determinanten der Ca <sup>2+</sup> -Permeation durch TRPC5 .....	90
3.4.3.2. Die Permeation von Mg <sup>2+</sup> durch TRPC5 .....	94
3.4.4. Permeation monovalenter Kationen durch TRPC5.....	96
3.4.4.1. Effekte von Alkalimetall-Ionen auf Ströme durch TRPC5-wt.....	97
3.4.4.2. Effekte monovalenter Kationen auf Ströme durch TRPC5-Mutanten.....	101
3.4.4.2.1. Relative Permeabilitäten der Porenmutanten für Alkalimetall-Ionen.....	101
3.4.4.2.2. Potenzierung der Ströme durch TRPC5-Punktmutanten durch Alkalimetall-Ionen.....	104
3.4.4.2.3. Einzelkanaluntersuchung der TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q.....	106
3.4.5. Ionenpermeation durch TRPC3 und TRPC6 .....	108
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>111</b>
4.1. Die Spannungsabhängigkeit der klassischen TRP-Kanäle.....	111
4.2. Effekte extrazellulärer Kationen auf Ströme durch TRPC5.....	117
4.3. Ionenpermeation durch TRPC5 .....	121
4.4. Bedeutung der biophysikalischen Charakteristika von TRPC5.....	130
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>133</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>138</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>154</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>155</b>
10.1. Eigene Publikationen .....	155
10.2. Ehrenwörtliche Erklärung .....	155
10.3. Tabellarischer Lebenslauf (gekürzt).....	156
10.4. Akademische Lehrer .....	157

# 1. Einleitung

## 1.1. Ca<sup>2+</sup> - abhängige Signalwege

### 1.1.1. Hauptelemente der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase

Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind intrazelluläre Botenstoffe, die eine prominente Rolle in der Regulation zahlreicher Prozesse, wie der Ausschüttung von Neurotransmittern (Llinas, 1982), der Muskelkontraktion (Ebashi, 1972) oder der Genexpression (van Haasteren *et al.*, 1999) spielen. Ca<sup>2+</sup> kann im Cytosol auch proapoptotische Wirkungen entfalten und den programmierten Zelltod beeinflussen (Boehning *et al.*, 2003). Es ist daher offensichtlich, dass Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege strengstens reguliert sein müssen, um die zelluläre Vitalität zu gewährleisten. Die Elemente, die zur Ca<sup>2+</sup>-Homöostase beitragen, und viele Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege sind in nahezu allen Zellen vorhanden und identisch. Im Cytosol von ruhenden Zellen wird die Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) durch aktiven Transport mit Hilfe von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, die in der Plasmamembran und in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) lokalisiert sind, auf einem sehr geringen Niveau (ca. 10<sup>-7</sup> M) gehalten. Die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (ca. 10<sup>-3</sup> M) und die im ER (ca. 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-6</sup> M), welches als Speicher- und Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsorganell fungiert, liegen hingegen um mehrere Größenordnungen über [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (siehe z.B. Petersen *et al.*, 2001). Der Export von cytosolischem Ca<sup>2+</sup> über die Plasmamembran wird hauptsächlich von Mitgliedern der Familie der *plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases* (PMCA) gewährleistet, die in allen eukaryontischen Zellen vorkommen (Penniston & Enyedi, 1998). Außerdem besitzen viele Zelltypen zusätzlich noch Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter, die den aktiven Ca<sup>2+</sup>-Export über die Plasmamembran an einen passiven Na<sup>+</sup>-Einstrom koppeln (Blaustein & Lederer, 1999). Der aktive Ca<sup>2+</sup>-Transport vom Cytosol in die internen Ca<sup>2+</sup>-Speicher geschieht durch die Aktivität der *sarco-/endoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (SERCA, siehe z.B. Misquitta *et al.*, 1999), die wie die PMCA eine P-Typ-ATPase ist. Die zelluläre Funktion aller dieser Proteine ist neben der Sicherstellung des niedrigen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auch die Termination von Ca<sup>2+</sup>-Erhebungen. Diese treten immer dann auf, wenn sich Ca<sup>2+</sup>-permeable Ionenkanäle in der ER- oder Plasmamembran öffnen und infolgedessen Ca<sup>2+</sup> aus den internen Speichern oder vom Extrazellularraum passiv ins Cytosol einströmen. Für die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus den internen Speichern sind hauptsächlich zwei Klassen von Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kanälen verantwortlich, Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR, für ein Review siehe z.B. Strigrow & Ehrlich, 1996). Mitglieder der RyR-Familie werden durch einen Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aktiviert, ein Mechanismus, der als *calcium-induced calcium release* (CICR) bezeichnet wird. Außerdem ist seit längerem bekannt, dass cADP-Ribose RyR aktiviert oder ihre Sensitivität für Ca<sup>2+</sup> steigert. Ähnlich der RyR werden auch



IP<sub>3</sub>R durch [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und durch einen intrazellulären Botenstoff, in diesem Falle Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), aktiviert. Die Expression von RyR und IP<sub>3</sub>R ist zelltypabhängig und kann beträchtlich variieren.

In der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen sind viele unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-permeable Ionenkanäle lokalisiert, die den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem extrazellulären Raum vermitteln. Die Klassifikation dieser Kanäle wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

### 1.1.2. PLC-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Signalwege

Sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Säugetierzellen führt die Applikation von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren oder Hormonen zu biphasischen Ca<sup>2+</sup>-Erhebungen, die auf der Aktivierung von Phospholipase C (PLC) - abhängigen Signalwegen beruhen (für ein Review siehe z.B. Putney & Bird, 1993). Die Komponenten dieser Signalwege sind schematisch in Abbildung 1.1 zusammengefasst. Die extrazelluläre Bindung von Liganden an G-Proteinkoppelnde Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt zur isoformspezifischen Aktivierung von PLCβ (GPCR) bzw. PLCγ (RTK). Diese spalten jeweils das membranständige Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), welche im weiteren Verlauf der Signalkaskade als sekundäre Botenstoffe fungieren. Während DAG ein potenter Agonist von fast allen Proteinkinase C (PKC) - Isoformen ist, bindet IP<sub>3</sub>, das aufgrund seiner Wasserlöslichkeit frei im Cytosol diffundieren kann, an die IP<sub>3</sub>Rs in der ER-Membran. Dies führt zu einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER und verstärkt so zusätzlich die Aktivität der meisten PKC-Isoformen, welche u.a. zahlreiche Zielproteine in der Plasmamembran (z.B. TRP-Kanäle) phosphorylieren können und dadurch deren Aktivität regulieren.

Der Stimulation von PLC folgt neben der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER über IP<sub>3</sub>Rs auch ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Plasmamembran, der zelltypspezifisch unterschiedliche Ausmaße und Charakteristika besitzt und von Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kanälen geleitet wird (Fasolato *et al.*, 1994, Elliott, 2001). Diese Kanäle werden aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus (*Gating-Mechanismus*) in spannungsabhängige (VOC = *voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel*) und spannungsunabhängige, Ca<sup>2+</sup>-permeable Kanäle unterteilt. Die spannungsunabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle können noch weiter in ligandengesteuerte (LOC = *ligand-gated Ca<sup>2+</sup> channel*), speicherregulierte (SOC = *store-operated Ca<sup>2+</sup> channel*) sowie durch intrazelluläre Botenstoffe aktivierte, speicherunabhängig regulierte Kanäle (ROC = *receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channel*) unterteilt werden. Ca<sup>2+</sup>-permeable Kanäle, die direkt durch die Bindung eines extrazellulär applizierten Liganden aktiviert werden, gehören zu den LOCs. Als Beispiel für einen LOC sei der durch Glutamat aktivierbare AMPA-Rezeptor aufgeführt. ROCs hingegen besitzen keine eigene Rezeptor-Domäne für

einen extrazellulären Liganden und werden nach Aktivierung eines geeigneten metabotropen Rezeptors erst durch intrazelluläre Signalwege aktiviert. Die speicherabhängig aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (SOCs) schließlich öffnen sich in Abhängigkeit vom (Ent-) Ladungszustand der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher.

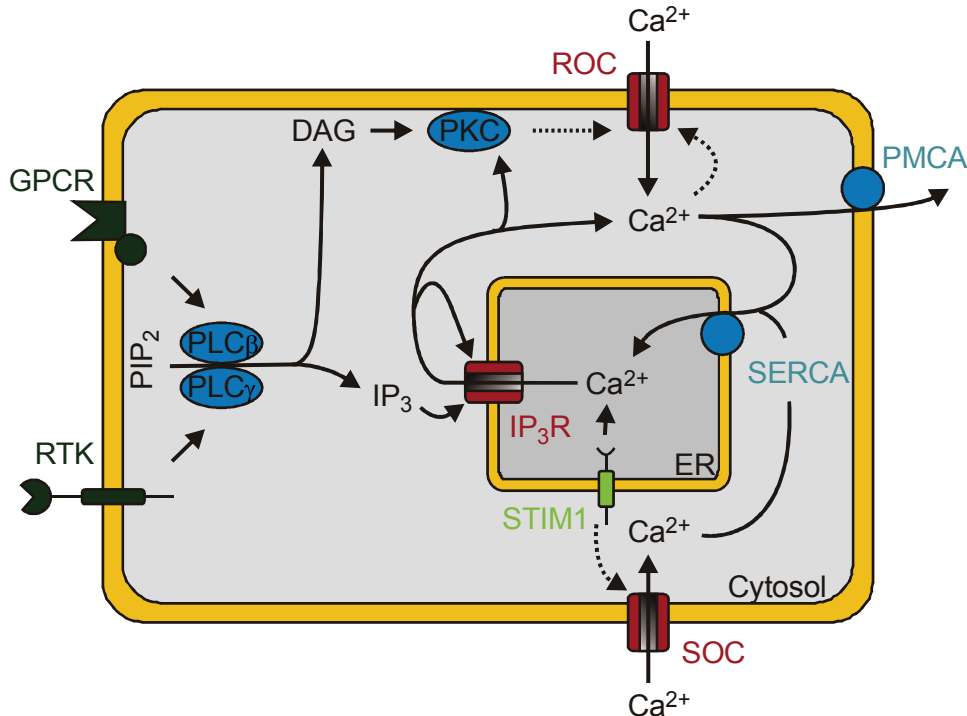


Abbildung 1.1: **PLC-Signalwege in Säugetierzellen.** Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt zu Phospholipase C (PLC) - abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhebungen im Cytosol, die durch Ionenkanäle in der Membran des Endoplasmatischen Reticulum (ER) sowie der Plasmamembran hervorgerufen werden.

## 1.2. Die Familie der TRP-Ionenkanäle

Erste Hinweise, welche Kanäle als ROCs in Säugetierzellen in Frage kommen, ergaben sich aus Studien, die sich mit dem visuellen System von *Drosophila* beschäftigten. Anders als bei Wirbeltieren, wo Lichtreize durch Aktivierung der Phosphodiesterase-6 und eine dadurch induzierte Senkung des cGMP-Spiegels verarbeitet werden, geht die Phototransduktion in *Drosophila* mit einer lichtinduzierten Aktivierung der PLC einher. Diese wird gefolgt von einem unselektiven Kationeneinstrom über die Plasmamembran, der schließlich zu einem depolarisierenden Potential führt (für ein Review siehe z.B. Minke & Selinger, 1996). In einem initialen Ansatz, die molekularen Komponenten der visuellen Signaltransduktion in *Drosophila* zu identifizieren, generierten Cosens und Manning (1969) Mutanten. Die Ströme nach Applikation von Lichtreizen wurden mit Hilfe von Elektretinogrammen (ERG) untersucht. Eine Mutante mit einem veränderten Gen auf dem 3. Chromosom zeigte transiente statt anhaltende ERG-Antworten nach verlängerter

Applikation von Licht. Der Name *trp* (= *transient receptor potential*), den diese Mutante erst viel später erhielt (Minke *et al.*, 1975), ist auf jene Messungen zurückzuführen. *Patch-Clamp*-Messungen an Ommatidien zeigten schließlich direkt, dass die *trp*-Mutante einen Defekt im PLC-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aufweist und damit das *trp*-Gen für einen Ionenkanal kodieren muss (Hardie & Minke, 1992). Neben TRP wurden in *Drosophila* noch weitere TRP-verwandte Proteine, wie z.B. TRPL (= TRP-like) oder TRP $\gamma$ , gefunden, die sich ebenfalls als  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle herausstellten (für ein Review siehe z.B. Montell, 2005). Die Ähnlichkeiten der Signalwege des visuellen Systems von *Drosophila* mit den PLC-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströmen in Säugetierzellen ließen schließlich die Existenz von Mammalia-TRP-Kanälen als mögliche ROCs oder SOCs vermuten, und animierte viele Arbeitsgruppen, nach solchen Proteinen zu suchen.

Derzeit sind fast 30 TRP-Isoformen aus Säugetierzellen bekannt, die entweder unselektive oder  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Kationenkanäle bilden und eine ähnliche Membrantopologie mit sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (TM), cytosolischen N- und C-Termini sowie einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6 aufweisen (Abb. 1.2A, für ein Review siehe z.B. Venkatachalam & Montell, 2007). Diese Eigenschaften platzieren TRP-Kanäle eindeutig in die Superfamilie der Kationen-selektiven Kanäle, zu der auch die spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $\text{K}_V$ ), die CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated channels*) und die HCN-Kanäle (*hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels*) sowie die spannungsabhängigen Natrium- ( $\text{Na}_V$ ) und Calciumkanäle ( $\text{Ca}_V$ ) gehören. Es ist weitgehend akzeptiert, dass funktionelle TRP-Kanäle, in Analogie zu CNG-, HCN- und  $\text{K}_V$ -Kanälen, eine tetramere Quartärstruktur besitzen, d.h. aus vier (gleichen oder verschiedenen) Untereinheiten zusammengesetzt sind. Basierend auf Sequenz- und Topologieanalysen, werden TRP-Kanäle grob in 2 Gruppen unterteilt (Venkatachalam & Montell, 2007). Gruppe-1-TRP-Kanäle sind dabei TRP aus *Drosophila* ähnlicher und werden auf der Grundlage von Sequenzähnlichkeiten noch weiter in die Subfamilien TRPC, TRPV, TRPM, TRPA sowie TRPN unterteilt, wobei Mitglieder der letzteren Subfamilie bisher nicht in Säugetieren gefunden wurden. Zu den Gruppe-2-TRP-Kanälen gehören die Mitglieder der Subfamilien TRPP und TRPML, die sich insbesondere durch eine große extrazelluläre Schleife zwischen TM1 und TM2 von den Gruppe-1-TRP-Kanälen unterscheiden. In den folgenden Abschnitten werden die Mitglieder der Gruppe-1-TRP-Kanäle näher beschrieben.

### 1.2.1. Die klassischen TRP-Kanäle (TRPC)

Die Mitglieder der Subfamilie der klassischen TRP-Kanäle (TRPC = *classical* oder *canonical* TRPs) weisen die größten Sequenzähnlichkeiten zu *Drosophila*-TRP auf ( $\geq 30\%$ ). Alle TRPCs haben zwei bis vier N-terminale Ankyrin-ähnliche Domänen und eine C-terminal von TM6 lokalisierte, konservierte Region, die als „TRP-Box“

bezeichnet wird. Diese enthält neben einem 7 Aminosäuren langen, invarianten Motiv (EWKFAR) auch eine Prolin-reiche Sequenz, die für das Gerüstprotein Homer eine Bindungsstelle darstellt (für ein Review siehe z.B. Venkatachalam & Montell, 2007). Bisher wurden insgesamt sieben TRPC-Isoformen (TRPC1-7) aus verschiedensten Säugetierzellen kloniert (z. B. Wes *et al.*, 1995, Zhu, 1995, Philipp *et al.*, 1996b, Zhu *et al.*, 1996, Boulay *et al.*, 1997, Okada *et al.*, 1998, Philipp *et al.*, 1998b, Liman *et al.*, 1999, Okada *et al.*, 1999, Vannier *et al.*, 1999). Eine phylogenetische Klassifizierung unterteilt diese in 4 Untergruppen. Die Gruppen 1 (TRPC1) und 2 (TRPC2) bestehen jeweils nur aus einem Mitglied, während die Gruppen 3 (TRPC3/6/7) und 4 (TRPC4/5) von mehreren TRPC-Isoformen gebildet werden (Abb. 1.2 *rechts*).

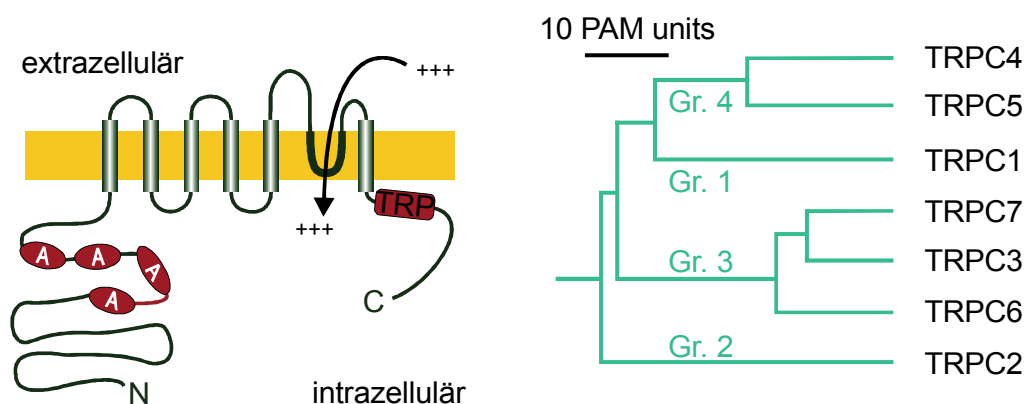


Abbildung 1.2: **Architektur und phylogenetischer Baum der TRPC-Subfamilie.** *Links:* Membrantopologie der Untereinheiten von TRPC-Kanälen. A = Ankyrin-ähnliche Domäne, TRP = TRP-Box. *Rechts:* Phylogenetischer Baum, der durch Alignment der klassischen TRP-Kanäle aus der Maus mithilfe des ClustalW-Algorithmus ermittelt wurde. Die Beschriftung in blau kennzeichnet die 4 Gruppen, in die die Mitglieder dieser Subfamilie eingeteilt werden.

Im heterologen Expressionssystem sind TRPC-Proteine als porebildende Untereinheiten sowohl von homo- als auch von heteromultimeren Kationenkanälen beschrieben worden (Lintschinger *et al.*, 2000, Strübing *et al.*, 2001, Hofmann *et al.*, 2002, Strübing *et al.*, 2003). Die biophysikalischen Eigenschaften von TRPC-Kanälen sind derzeit noch sehr umstritten. Es ist generell akzeptiert, dass Kanäle, die aus TRPC-Untereinheiten gebildet werden, wie die meisten anderen TRP-Kanäle, permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  sind. In den meisten Studien werden TRPC-Kanäle dabei als unselektive,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle charakterisiert (z.B. Zitt *et al.*, 1997, Hofmann *et al.*, 1999, Schaefer *et al.*, 2000). Im Widerspruch zu diesen Daten wurde in einigen anderen Untersuchungen jedoch beobachtet, dass manche Mitglieder der TRPC-Familie  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv sind (Philipp *et al.*, 1998a, Warnat *et al.*, 1999). Die Ursachen dieser kontradiktorischen Befunde sind noch weitgehend unklar (Plant & Schaefer, 2005).

Die Aktivierung von TRPC-Kanälen erfolgt intrazellulär nach Stimulation PLC-abhängiger Signalwege (Abb. 1.1, für ein Review siehe Venkatachalam & Montell, 2007). Kontrovers diskutiert werden jedoch zurzeit die Signalwege und Mechanismen, welche die Stimulation der PLC mit der Öffnung von TRPC-Kanälen verbinden. Dabei ist insbesondere die Frage, ob diese Kanäle speicherabhängig reguliert werden, sehr umstritten. Nahezu alle Kanäle, die von Mitgliedern der TRPC-Familie gebildet werden, sind bisher sowohl als SOC als auch als ROC beschrieben worden (für ein Review siehe z.B. Plant & Schaefer, 2005). Die widersprüchlichen Resultate könnten einerseits durch unterschiedliche Expressionslevel der Kanäle im Überexpressionssystem und in nativen Zellen zustande kommen (Putney, 2004). Dieser Erklärungsansatz basiert auf der Annahme, dass für die Bildung von funktionellen TRPC-Kanälen zusätzliche, endogene Interaktionspartner notwendig sind. Ein möglicher Kandidat hierfür könnte der ubiquitär vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor des ER, STIM-1, darstellen (z.B. Yuan *et al.*, 2007). Andererseits wäre es auch möglich, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der TRPC-Kanäle aus den verschiedenen Speziesvarianten, die jeweils untersucht wurden, resultieren (Plant & Schaefer, 2005).

Für rekombinante Gruppe-3-TRPC-Kanäle ist in zahlreichen Studien gezeigt worden, dass diese direkt durch DAG und unabhängig von PKC aktiviert werden können (z.B. Hofmann *et al.*, 1999, Okada *et al.*, 1999, Venkatachalam *et al.*, 2001). Damit ist bei diesen Kanälen die Verbindung zwischen der PLC-Stimulation und der Kanalaktivität bekannt, welche die Gruppe-3-TRPCs klar als ROCs definiert. Verfechter der speicherabhängigen Regulation dieser Kanäle zweifeln zwar die physiologische Signifikanz der direkten DAG-Aktivierung generell an (z.B. Kiselyov & Muallem, 1999). Jedoch wurde die Bedeutung dieses Mechanismus in nativen Zellen am Beispiel von TRPC2 bereits nachgewiesen (Lucas *et al.*, 2003). Ein wichtiges Kennzeichen von Rezeptor-vermittelten Strömen durch TRPC4 und TRPC5 ist ihre Abhängigkeit von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Schaefer *et al.*, 2000). Dies ist ein klares Indiz gegen eine Beteiligung dieser Kanäle an speicherregulierten Strömen in nativen Zellen (Clapham, 2007). Neben PLC-abhängigen Signalwegen sind für TRPC4 und TRPC5 auch weitere Stimulatoren bekannt. So konnte TRPC5 im heterologen Expressionssystem sowohl direkt durch Lysophospholipide (Flemming *et al.*, 2006) als auch durch Stickstoffmonoxid (NO) über Cystein-S-Nitrosylierung (Yoshida *et al.*, 2006) aktiviert werden. Als Modulatoren von Strömen durch TRPC4 und TRPC5 sind außerdem  $\text{Ca}^{2+}$  und Lanthanoide bekannt, die von der extrazellulären Seite der Plasmamembran wirken und deren Effekte im nachfolgenden Abschnitt (siehe Kap. 1.3.2) näher beschrieben werden. Für TRPC1 ist umstritten, ob überhaupt funktionelle, homomultimere Kanäle existieren. In Kombination mit Gruppe-4-TRPCs bildet TRPC1 jedoch unbestritten funktionelle Kationenkanäle, welche speicherunabhängig reguliert werden (Strübing *et al.*,

2001). Eine weitere Möglichkeit der Regulation von TRPC-Kanälen nach Stimulation PLC-abhängiger Signalwege besteht in der schnellen Fusion von submembranären (TRPC-enthaltenden) Vesikeln mit der Plasmamembran. Diese Art der Regulierung von Kanalaktivität durch Steuerung der Oberflächenexpression ist bisher für TRPC3, TRPC4 und TRPC5 beschrieben worden (Bezzerrides *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2004, Odell *et al.*, 2005). Die Mechanismen, die letztendlich zur Vesikelfusion führen, sind jedoch bei allen drei Kanälen verschieden.

Die gewebs- und zelltypspezifische Expression von TRPCs wurde bereits in zahlreichen Studien, meist auf mRNA-Ebene, untersucht (Garcia & Schilling, 1997, Otsuka *et al.*, 1998, Mizuno *et al.*, 1999, Sylvester *et al.*, 2001, Walker *et al.*, 2001, Riccio *et al.*, 2002b). Wie in Tabelle 1.1 zusammengefasst, kommt TRPC1-mRNA ubiquitär vor (Wes *et al.*, 1995, Zhu *et al.*, 1995, Funayama *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 1997, Sinkins *et al.*, 1998, für Reviews siehe Beech, 2005, Rychkov & Barritt, 2007), während Transkripte des TRPC2-Gens, das beim Menschen ein Pseudogen ist, hauptsächlich im vomeronasalen Organ (VNO) von Ratten und Mäusen sowie im Maushoden gefunden wurde (Wes *et al.*, 1995, Liman *et al.*, 1999, Vannier *et al.*, 1999). Die Expression von TRPC3 ist im Gehirn am höchsten, jedoch kommt diese TRP-Isoform auch in der Hypophyse, dem Herz und der Lunge vor (Garcia & Schilling, 1997, Zhu *et al.*, 1998, Mizuno *et al.*, 1999, Riccio *et al.*, 2002a). TRPC6 findet sich vor allem in glatten Muskelzellen und im *Gyrus dentatus* (Hippocampus), wurde jedoch auch in verschiedenen Zelltypen der Niere nachgewiesen (Bonaventure *et al.*, 2002, Jung *et al.*, 2002, Beech *et al.*, 2004, Reiser *et al.*, 2005). Auch die Expression von TRPC7 erstreckt sich über zahlreiche Gewebe, und wurde vor allem auf RNA-Ebene im Gehirn, im Herz, in der Lunge und dem Auge gefunden (Okada *et al.*, 1999, für ein Review siehe Numaga *et al.*, 2007). TRPC4 und TRPC5 werden überwiegend im Gehirn exprimiert, finden sich aber auch in glatten Muskelzellen des Intestinaltrakts sowie in Knochen, dem Pankreas, der Prostata (TRPC4, Walker *et al.*, 2001, Riccio *et al.*, 2002b) oder Spermien, der Leber und dem Herzen (TRPC5, Riccio *et al.*, 2002b, Sutton *et al.*, 2004, Beech, 2007, für ein Review siehe Cavalié, 2007).

Über die physiologische Bedeutung von TRPC-Kanälen war lange Zeit sehr wenig bekannt, jedoch haben die Generierung von *Knock-out*- und transgenen Mausmodellen sowie der Einsatz von RNAi die Erforschung der biologischen Funktion dieser Kanäle in den letzten Jahren merklich vorangebracht. Die Beteiligung von TRPCs am Neuritenwachstum und synaptischer Aktivität sowie an der Regulation des Gefäßtonus von glatten Muskelzellen stand dabei im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. TRPC3, und möglicherweise auch TRPC1, spielen demnach eine Rolle bei der BDNF-abhängigen Lenkung der Wachstumskegel in maturierenden Gehirnen (Li *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2005, Shim *et al.*, 2005, Wang & Poo, 2005), während TRPC6 wichtig für die Ausbildung exzitatorischer Synapsen ist (Zhou *et al.*, 2008).

Für TRPC5 wurde hingegen ein inhibitorischer Effekt auf das Längenwachstum von Neuriten in CA1-Neuronen des Hippocampus beschrieben (Greka *et al.*, 2003). Zusätzlich ist seit kurzem aus einer Arbeit an *Knock-out*-Mäusen bekannt, dass die Expression von TRPC5 in der Amygdala eine Rolle beim angeborenen Angstverhalten spielt (Ricchio *et al.*, 2009). Eine Veränderung der synaptischen Aktivität tritt bei TRPC4<sup>-/-</sup>-Mäusen auf, wobei die GABA-Ausschüttung der thalamischen Interneuronen signifikant reduziert ist (Munsch *et al.*, 2003). TRPC-Kanäle sind auch an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt, wie Arbeiten an glatten Muskelzellen (Zholos & Bolton, 1996, Zholos & Bolton, 1997, Jung *et al.*, 2002) und Endothelzellen (Chang *et al.*, 1997, Groschner *et al.*, 1998) bereits lange vermuten ließen. Am Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien, welcher zur Kontraktion führt, sind TRPC6 und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch TRPC3 beteiligt (Dietrich *et al.*, 2005, für ein Review siehe Dietrich *et al.*, 2007). Die Kontraktion glatter Muskelzellen aus dem Darm ist hingegen vor allem bei TRPC4<sup>-/-</sup>-Mäusen, zu einem geringen Teil aber auch bei TRPC6-*Knock-out*-Tieren gestört

Tabelle 1.1: Hauptexpressionsorte von TRPC-Kanälen *in vivo*.

mRNA	Hauptexpressionsorte	Literatur
TRPC1	ubiquitär	Wes <i>et al.</i> , 1995, Zhu <i>et al.</i> , 1995, Funayama <i>et al.</i> , 1996, Chang <i>et al.</i> , 1997, Sinkins <i>et al.</i> , 1998,
TRPC2	VNO, Testis	Wes <i>et al.</i> , 1995, Liman <i>et al.</i> , 1999, Vannier <i>et al.</i> , 1999 Garcia & Schilling, 1997,
TRPC3	Gehirn	Zhu <i>et al.</i> , 1998, Mizuno <i>et al.</i> , 1999, Ricchio <i>et al.</i> , 2002b
TRPC4	Gehirn, Endothelgewebe, Nebenniere, Retina, Testis, gl. Muskulatur	Ricchio <i>et al.</i> , 2002b, Walker <i>et al.</i> , 2001
TRPC5	Gehirn	Ricchio <i>et al.</i> , 2002b, Sutton <i>et al.</i> , 2004, Beech, 2007
TRPC6	Lunge, Gehirn, Placenta, gl. Muskulatur	Bonaventure <i>et al.</i> , 2002, Jung <i>et al.</i> , 2002, Beech <i>et al.</i> , 2004, Reiser <i>et al.</i> , 2005
TRPC7	Gehirn, Herz, Lunge, Auge, Uterus	Okada <i>et al.</i> , 1999

(Tsvilovskyy *et al.*, 2009). TRPC4 vermittelt in Endothelzellen außerdem einen Acetylcholin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der zur Vasodilatation führt (Freichel *et al.*, 2001).

### 1.2.2. Die Vanilloid-Familie der TRP-Kanäle (TRPV)

Im Säugetiergenom sind zurzeit 6 Gene bekannt, die für Untereinheiten von TRPV-Kanälen kodieren (Venkatachalam & Montell, 2007). Strukturelle Merkmale sind einerseits die für TRP-Kanäle typische Membrantopologie und andererseits drei bis sechs N-terminale Ankyrin-ähnliche Domänen. Bei Mitgliedern der TRPV-Subfamilie fehlt die C-terminal von TM6 lokalisierte TRP-Box, welche bei den Mitgliedern der TRPC-Subfamilie vorhanden sind. Namensgebend für die TRPV-Kanäle (*vanilloid* TRP channels) war der erste klonierte Vertreter dieser Subfamilie, der *vanilloid receptor 1* (VR1, heute TRPV1, Caterina *et al.*, 1997, Montell *et al.*, 2002), der jedoch als einziges Mitglied durch Vanilloidverbindungen stimuliert wird. TRPV1 wurde 1997 durch Expressionsklonieren entdeckt und wird neben Verbindungen mit Vanilloidkomponente (z.B. Capsaicin) durch zahlreiche weitere Stimuli wie z.B. Protonen ( $\text{H}^+$ ;  $\text{pH} \leq 5.5$ ), durch das Endocannabinoid Anandamid und Hitze ( $\geq 42^\circ\text{C}$ ) reguliert (für ein ausführliches Review siehe Pingle *et al.*, 2007). Temperatur ist auch ein Regulator der Aktivität von TRPV2 ( $>52^\circ\text{C}$ ), TRPV3 ( $33-35^\circ\text{C}$ ) und TRPV4 ( $25-34^\circ\text{C}$ ). Zusammen mit den durch Kälte aktivierten TRP-Kanälen TRPM8 (siehe Kap. 1.2.3), TRPA1 ( $<17^\circ\text{C}$ , siehe Kap. 1.2.4) sowie TRPM5 ( $15-35^\circ\text{C}$ , siehe Kap. 1.2.3) bilden TRPV1-4 die sogenannten Thermo-TRPs (siehe z.B. Patapoutian *et al.*, 2003). Das Spektrum an chemischen und mechanischen Stimuli, die TRPV-Kanäle regulieren, ist sehr groß (für ein Review siehe z.B. Nilius & Voets, 2005). Es umfasst zum einen Reize, die die Aktivität mehrerer TRPV-Kanäle direkt oder indirekt modulieren, z.B. 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-ABP, TRPV1-3, 6), mehrfach ungesättigte Fettsäuren (TRPV3, 4) oder hypotonisch induziertes Anschwellen der Zellen (TRPV2, 4). Zum anderen sind auch Substanzen bekannt, die spezifisch nur eine TRPV-Isoform ansprechen. Beispiele hierfür sind insbesondere die charakteristischen Komponenten aus verschiedenen Gewürzen, wie Capsaicin, Piperin und Campher, welche Schärfe vermitteln (TRPV1), oder Carvacrol, Eugenol und Thymol, die jeweiligen Hauptkomponenten in Oregano, Nelken und Thymian (TRPV3). Entsprechend ihrer Expression im peripheren Nervengewebe gelten TRPV1-4 als primäre Rezeptoren für thermische und chemische Reize (für ein Review siehe z.B. Voets *et al.*, 2005). Eine Sonderrolle in der Familie der TRP-Kanäle nehmen TRPV5 und TRPV6 ein, die anders als alle anderen TRPs hochselektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ ) sind (Owsianik *et al.*, 2005). Beide Kanäle werden über den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) reguliert und sind am Vitamin  $\text{D}_3$ -regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in Darm und Niere beteiligt (für ein Review siehe z.B. Wissenbach & Niemeyer, 2007).



### 1.2.3. Die Subfamilie der TRPM-Kanäle

Die Subfamilie der TRPM-Kanäle wurde nach ihrem ersten bekannten Vertreter, Melastatin-1 (heute TRPM1) benannt. Sie umfasst 8 Transmembranproteine in Säugtieren, die wahrscheinlich alle als porebildende Kanaluntereinheiten fungieren (für ein Review siehe z.B. Venkatachalam & Montell, 2007). TRPM-Proteine besitzen eine TRP-Box C-terminal von TM6, jedoch keine Ankyrin-ähnlichen Domänen N-terminal der Transmembranregion. Aufgrund des unterschiedlich großen C-Terminus variieren die Mitglieder der TRPM-Subfamilie stark in ihrer Gesamtlänge (ca. 1000-2000 Aminosäuren). Auch auf funktioneller Ebene zeigt sich eine große Diversität in den Charakteristika von TRPM-Kanälen. Exklusiv im C-Terminus von TRPM2, TRPM6 und TRPM7 existieren z.B. Enzymdomänen. Die Stimuli, die die Aktivität von TRPM-Kanälen regulieren, sind ebenfalls sehr vielfältig und schließen sowohl sekundäre Botenstoffe (TRPM2), Zellschwellung, Steroidhormone (TRPM3), die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - (TRPM4/5) und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration (TRPM6/7) als auch Temperatur und extrazelluläre Liganden (TRPM5, 8) mit ein. Relativ wenig direkte experimentelle Evidenz gibt es zurzeit zur physiologischen Rolle der Vertreter der TRPM-Subfamilie. Jedoch geben sowohl die Expressionsmuster als auch die biophysikalischen Eigenschaften, die aus Studien im Überexpressionssystem ermittelt wurden, konkrete Hinweise auf mögliche Funktionen *in vivo*. TRPM8, das vorwiegend in Neuronen der trigeminalen und Spinalganglien exprimiert wird, ist höchstwahrscheinlich an der Erkennung und Transduktion von Kälte und kälte-assoziierten chemischen Reizen, wie z.B. Menthol, beteiligt (für ein Review siehe z.B. Voets *et al.*, 2007b). Während TRPM6 hauptsächlich im Darm und in der Niere exprimiert wird, kommt TRPM7 nahezu ubiquitär vor. Ein *Knock-out* des TRPM7-Gens in Mäusen ist bereits in frühen embryonalen Stadien letal, und Mutationen in TRPM6 führen zu Hypomagnesämie mit sekundärer Hypocalcämie (siehe z.B. Penner & Fleig, 2007). Die Permeabilität von TRPM6 und TRPM7 für  $\text{Mg}^{2+}$  und andere divalente Ionenspezies, darunter auch Spurenelemente wie Zink, deutet daher auf eine Rolle dieser Kanäle im zellulären und systemischen Haushalt vor allem von  $\text{Mg}^{2+}$ , möglicherweise auch anderer Mineralien hin (für Reviews siehe z.B. Bodding, 2007, Penner & Fleig, 2007). Im Gegensatz dazu sind TRPM4 und TRPM5 ausschließlich für monovalente Kationen permeabel, ein Sonderfall innerhalb der TRP-Familie. Für TRPM5 konnte eine Funktion in der Reizweiterleitung in Geschmacksknospen im Zusammenhang mit süßen, bitteren und umami schmeckenden Substanzen nachgewiesen werden (Talavera *et al.*, 2005). TRPM2, TRPM4 und TRPM5 könnten außerdem eine Rolle bei der Insulinsekretion spielen (für ein Review siehe Cheng *et al.*, 2007).

### 1.2.4. TRPA1

Der erste Mammalia-Vertreter aus der TRPA-Subfamilie wurde aus humanen Fibroblasten kloniert und aufgrund seiner zahlreichen N-terminalen Ankyrin-ähnlichen Domänen sowie seines C-terminalen Transmembranbereiches zunächst als ANKTM1 (ANK = Ankyrin-ähnliche Wiederholungen, TM = Transmembranbereich) bezeichnet (für ein Review siehe Venkatachalam & Montell, 2007). Das heute als TRPA1 bezeichnete Protein ist in Säugetieren der einzige bekannte Vertreter der TRPA-Familie. Es bildet, wie andere TRP-Kanäle auch, im heterologen und im nativen System funktionelle Kationenkanäle. Die Expression findet *in vivo* hauptsächlich in trigeminalen und Spinalganglien statt, aber auch in Haarzellen des Innenohres, im Hoden und der Milz. Da TRPA1 durch charakteristische Komponenten aus einigen Gewürzen wie Senf (Isothiocyanate), Knoblauch (Allicin) oder Zimt (Zimtaldehyd) aktiviert werden kann, liegt eine Rolle dieses Kanals als Primärrezeptor für die Transduktion noxischer Reize auf der Hand. TRPA1 wird, wie auch TRPM8, durch Kälte ( $<17^{\circ}\text{C}$ ) und Icilin stimuliert, jedoch scheint es neben diesen beiden Kanälen noch weitere Kälterezeptoren im Organismus zu geben (Babes *et al.*, 2004). Die zahlreichen Ankyrin-ähnlichen Domänen in TRPA1 ermöglichen die Interaktion mit dem Cytoskelett. Aufgrund seiner Präsenz in Haarzellen galt TRPA1 daher einige Zeit als Kandidat für den primären Mechanorezeptor im Innenohr (Corey *et al.*, 2004). Weil sich TRPA1<sup>-/-</sup>-Mäuse in einer späteren Studie jedoch nicht als taub herausstellten, musste diese These wieder verworfen werden (Kwan *et al.*, 2006).

## 1.3. Biophysikalische Charakteristika von TRP-Kanälen

### 1.3.1. Die Spannungsabhängigkeit von TRP-Kanälen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, durch welch vielfältiges Repertoire an chemischen und physikalischen Stimuli TRP-Kanäle reguliert werden können. Ein weiteres Charakteristikum vieler TRP-Kanäle ist ihre Spannungsabhängigkeit. In einigen Fällen zunächst bei nativen Strömen beobachtet (z.B. Zholos & Bolton, 1994) und später auch im Überexpressionsmodell studiert (z.B. Gunthorpe *et al.*, 2000), wurden 2004 erstmals einfache Modelle postuliert (*Two-State-Model*, Voets *et al.*, 2004). Gemäß dem *Two-State-Model* werden TRP-Kanäle (z.B. TRPV1 und TRPM8) wie andere, klassische spannungsabhängige Kanäle (z.B. K<sub>v</sub>s) primär durch Membrandepolarisation aktiviert. Die Beziehung zwischen der Aktivität (Offenwahrscheinlichkeit) eines Kanals und dem Membranpotential ist bei einem *Two-State-Model* sigmoidal ( $P_o$ -V, Abb. 1.3A). Kennzeichen dieser Beziehung sind eine minimale Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{o,\min} = 0$ ) bei sehr kleinen, und eine maximale Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{o,\max} = 1$ ) bei sehr hohen

Membranpotentialen. Die ansteigende Phase zwischen  $P_{o,min}$  und  $P_{o,max}$  hat einen halbmaximalen Wert ( $P_o = 0,5$  bei  $V_{1/2}$ ) und verläuft umso steiler, je stärker die Spannungsabhängigkeit bei einem Kanal ausgeprägt ist. Molekular determiniert ein sogenannter Spannungssensor die Öffnung und Schließung des Kanals in Abhängigkeit vom Membranpotential. Bei  $K_v$ s wird der Spannungssensor durch basische Aminosäuren in TM4 gebildet, die sich aufgrund ihrer positiven Ladung entlang des elektrischen Felds der Membran bewegen (Aggarwal & MacKinnon, 1996, Seoh *et al.*, 1996). Auch bei TRPM8 befinden sich im Bereich zwischen TM4 und TM5 positiv geladene Reste, die am Aufbau des Spannungssensors beteiligt sind (Voets *et al.*, 2007a). Ein Maß für die Anzahl der beteiligten Ladungen am Spannungssensor ist die *gating charge* ( $z$ ). TRP-Kanäle besitzen im Vergleich zu  $K_v$ s ( $z \sim 14 e$ ) eine viel geringere *gating charge* (z.B. TRPM8:  $z \sim 0,9 e$ ), und weisen somit eine deutlich schwächere Spannungsabhängigkeit auf. Die  $P_o$ - $V$ -Beziehungen der temperaturregulierten TRP-Kanäle TRPV1 und TRPM8 zeichnen sich im Ruhezustand neben dem relativ flachen Anstieg durch eine sehr hohe halbmaximale Aktivierungsspannung aus ( $V_{1/2} > 100$  mV). Temperaturerhöhung oder Bindung von Capsaicin (TRPV1) bzw. Senkung der Temperatur oder Mentholbindung (TRPM8) verschieben jedoch die  $P_o$ - $V$ -Kurven zu weniger depolarisierenden Potentialen, was zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle bei physiologischen Membranspannungen führt (Abb. 1.3B). Auch andere TRP-Kanäle

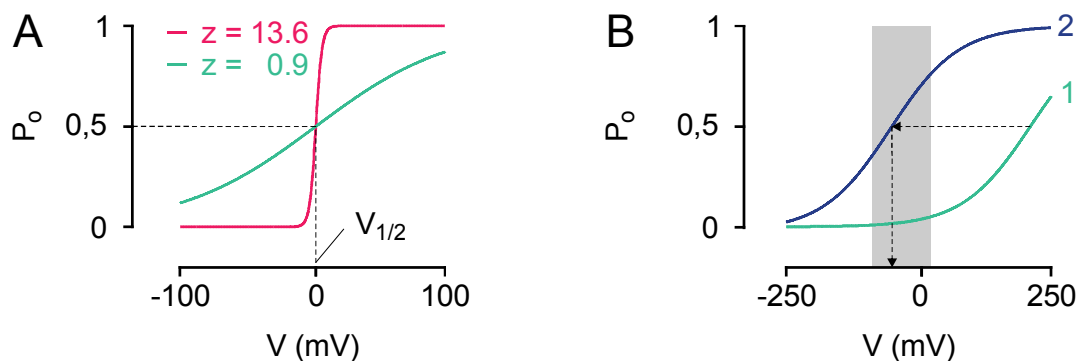


Abbildung 1.3: **Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen nach dem *Two-State-Model*.** A: Aktivität (Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$ ) von zwei Kanälen mit unterschiedlicher Spannungsabhängigkeit (*Gating Charge*  $z$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $V$ ). Beide Kanäle sind bei 0 mV halbmaximal aktiviert ( $V_{1/2} = 0$  mV). Eine größere *Gating Charge* (rot,  $z = 13,6$ ) führt zu einem schärferen Übergang vom minimal offenen ( $P_o=0$ ) zum maximal aktivierten Zustand ( $P_o = 1$ ). B: Die Aktivierung von spannungsabhängigen TRP-Kanälen durch Temperatur oder Ligandenbindung ist an eine Verschiebung der Werte für  $V_{1/2}$  gekoppelt. Durch diese Verschiebung (gestrichelte Pfeile) steigt die Aktivität ( $P_o$ ) des Kanals bei physiologischen Membranpotentialen (graue Box).

zeigen eine spannungsabhängige Regulation (z.B. TRPM4 und TRPM5, Nilius *et al.*, 2005b, Talavera *et al.*, 2005). Für die temperatur- und ligandengesteuerte Aktivierung von TRP-Kanälen gilt das *Two-State-Model* daher als ein fundamentales Prinzip, von dem es jedoch auch Ausnahmen gibt (Nilius *et al.*, 2005b). Zum

Beispiel kann die temperaturabhängige Aktivierung von TRPV4 nicht durch Spannungsabhängigkeit erklärt werden (Watanabe *et al.*, 2002). Auch über die Einfachheit eines Modells mit nur zwei Zuständen (*Two-State*) räumen Nilius *et al.* (2005) ein, dass es „...möglicherweise eine Übersimplifizierung aller Feinheiten des Gatings ...“ ist. Für die Spannungsabhängigkeit von TRPV1 und TRPM8 sind aus diesem Grunde auch allosterische Modelle verwendet worden (Brauchi *et al.*, 2004, Matta & Ahern, 2007). Die Notwendigkeit von Modellen, die komplizierter als das *Two-State-Model* sind, ist jedoch noch weitgehend umstritten (Voets *et al.*, 2007a).

### 1.3.2. Effekt von extrazellulären Kationen auf Ströme durch TRP-Kanäle

Die meisten TRP-Kanäle leiten relativ unselektiv sowohl mono- als auch divalente Kationen (Owsianik *et al.*, 2005). Neben ihrer Permeation, die im nachfolgenden Abschnitt behandelt wird (siehe Kap. 1.3.3), können Kationen jedoch auch die Offenwahrscheinlichkeit einiger TRP-Kanäle modulieren. Im Falle von TRPV1 wurde gezeigt, dass hohe extrazelluläre Konzentrationen an mono- ( $\text{Li}^+$ ) und divalenten ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) Kationen den Kanal aktivieren und sensibilisieren können (Ahern *et al.*, 2005). Eine weitere Studie an diesem Kanal demonstrierte, dass das Entfernen von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt, der vergleichbar mit pH- oder Capsaicin-aktivierten Strömen durch TRPV1 ist (Ohta *et al.*, 2008). Somit scheint extrazelluläres  $\text{Na}^+$  die Aktivität von TRPV1 negativ zu regulieren, ein attenuativer Effekt, der physiologische Relevanz in der Nocizeption haben könnte. Molekulare Determinanten dieses Mechanismus sind zwei Glutamatreste (E600 und E648), die auf der extrazellulären Seite der Membran die Poreregion flankieren. Interessanterweise sind diese Aminosäuren auch an der Aktivierung und Potenzierung von TRPV1 durch extrazelluläre  $\text{H}^+$  (Jordt *et al.*, 2000) und durch extrazelluläres Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) in mikromolaren Konzentrationen (Tousova *et al.*, 2005) verantwortlich. Bemerkenswerterweise sind Lanthanoide wie  $\text{Gd}^{3+}$  eigentlich dafür bekannt, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kanäle durch hochaffine Bindung an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivitätsfilter in der Pore (*open channel block*) stark zu inhibieren vermögen (Lettvin *et al.*, 1964, Mayer *et al.*, 1972), und werden daher üblicherweise als unspezifische Blocker dieser Kanäle verwendet. Auch für TRP-Kanäle ist ein Block der Ströme durch Lanthanoide eher die Regel als die Ausnahme, wie z.B. für TRPC1 und TRPC3/6/7 übereinstimmend in zahlreichen Studien beschrieben wurde (Zitt *et al.*, 1996, Zhu *et al.*, 1998, Kamouchi *et al.*, 1999, Okada *et al.*, 1999, Inoue *et al.*, 2001, Riccio *et al.*, 2002a, Jung *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu können Ströme durch TRPC4, TRPC5 sowie durch den heteromultimeren Kanal TRPC1/5 ebenso wie TRPV1 durch Lanthanoide potenziert werden (Schaefer *et al.*, 2000, Strübing *et al.*, 2001, Schaefer *et al.*, 2002, Jung *et al.*, 2003). Zumindest im Falle von TRPC5 geschieht dies über einen Mechanismus, der ebenfalls von zwei Glutamatresten auf der extrazellulären Seite der Membran

(E543 und E595) determiniert wird (Jung *et al.*, 2003). Mit *Patch-Clamp*-Experimenten im *Outside-Out*-Modus konnten Jung *et al.* (2003) außerdem zeigen, dass durch die extrazelluläre Applikation von Lanthanoiden die Einzelkanal-amplitude konzentrationsabhängig abnimmt, und die Potenzierung durch drastische Erhöhungen der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit zustande kommt. Folglich ist ein *open channel block* durch Lanthanoide trotz Potenzierung der Ganzzellströme auch bei TRPC5 präsent. Bei hohen Konzentrationen an  $\text{La}^{3+}$  oder  $\text{Gd}^{3+}$  (im millimolaren Bereich) überwiegt dieser Effekt gegenüber der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und es kommt zu einer Abnahme der Ganzzellströme durch TRPC5. Da auch TRPV1 bei hohen extrazellulären Konzentrationen an Lanthanoiden blockiert wird (Tousova *et al.*, 2005), ist ein ähnlicher Mechanismus wahrscheinlich, bei dem die dreiwertigen Kationen zwar die offenen Kanäle blockieren, zunächst aber eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit zu einer Vergrößerung der Ganzzellströme führt.

Saure pH-Werte haben ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die meisten Kationenkanäle. Dies ist vermutlich auf eine unspezifische Protonierung von negativ geladenen Seitenketten in der Pore zurückzuführen. Auch die meisten TRP-Kanäle sind sensitiv für extrazelluläre  $\text{H}^+$ . Im Fall von TRPV5 (E522, Yeh *et al.*, 2003) sowie TRPM5 (H934, Liu *et al.*, 2005) wurden bereits entsprechende protonierbare Aminosäuren in der Nähe bzw. innerhalb der Pore identifiziert. Im Gegensatz dazu werden Ströme durch TRPV1 durch  $\text{H}^+$  aktiviert und potenziert. Die molekularen Determinanten dieser Effekte sind die Glutamatreste E600 und E648 (Jordt *et al.*, 2000), welche auch an der Potenzierung des Kanals durch Lanthanoide und Metallionen beteiligt sind (Ahern *et al.*, 2005, Tousova *et al.*, 2005). Mit TRPM7 ist außerdem noch ein weiterer TRP-Kanal bekannt, der durch extrazelluläre  $\text{H}^+$  potenziert wird (Jiang *et al.*, 2005). Die pH-Sensitivität dieses Kanals wird dabei ebenfalls durch einen Glutamatrest (E1047) innerhalb der Porenregion determiniert (Li *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Determinanten der Ionenpermeation durch TRP-Kanäle

Die Selektivität und die Leitfähigkeit eines Kanals für eine bestimmte Ionenspezies werden durch die Beschaffenheit der Pore determiniert. Bei der Permeation durch die Pore müssen Ionen geladene und/oder polare Bindungsstellen überwinden, die von den Seitenketten der Aminosäuren oder vom Peptidrückgrat der Kanaluntereinheiten angeboten werden. Röntgenstrukturanalysen am Kaliumkanal aus *Streptomyces lividans* (KcsA) zeigten, dass Bindungsstellen für monovalente Kationen hauptsächlich von Sauerstoffatomen aus den Peptidbindungen des Kanals oder aus den Seitenketten polarer Aminosäuren gebildet werden (Serin, Threonin, Doyle *et al.*, 1998, Zhou & MacKinnon, 2003). Im Gegensatz dazu beruhen selektive Bindungsstellen für divalente Kationen in biologischen Molekülen

fast ausschließlich auf negativ geladenen Carboxylatgruppen; in der Pore eines Kanals werden diese von den Seitenketten saurer Aminosäuren zur Verfügung gestellt (für ein Review siehe Sather & McCleskey, 2003).

Röntgenstrukturanalysen an verschiedenen  $K^+$ -Kanälen erlaubten erstmals Einblicke in den dreidimensionalen Aufbau von Kationenkanälen (z.B. Doyle *et al.*, 1998, Jiang *et al.*, 2003). Die Porenregionen dieser Kanäle weisen prinzipielle strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Sie sind jeweils aus einer proximalen Schleife, einer Porenhelix, dem Selektivitätsfilter und einer distalen Schleife aufgebaut (Abb. 1.4A). Dabei sind Aminosäuren der proximalen Schleife am Aufbau des äußeren Vestibüls beteiligt und die Porenhelix ermöglicht die Ausbildung eines trichterförmigen Eingangs in das Innere der Pore (Abb. 1.4B). Der Selektivitätsfilter kleidet schließlich den engsten Bereich der Pore aus. Für TRP-Kanäle ist derzeit noch

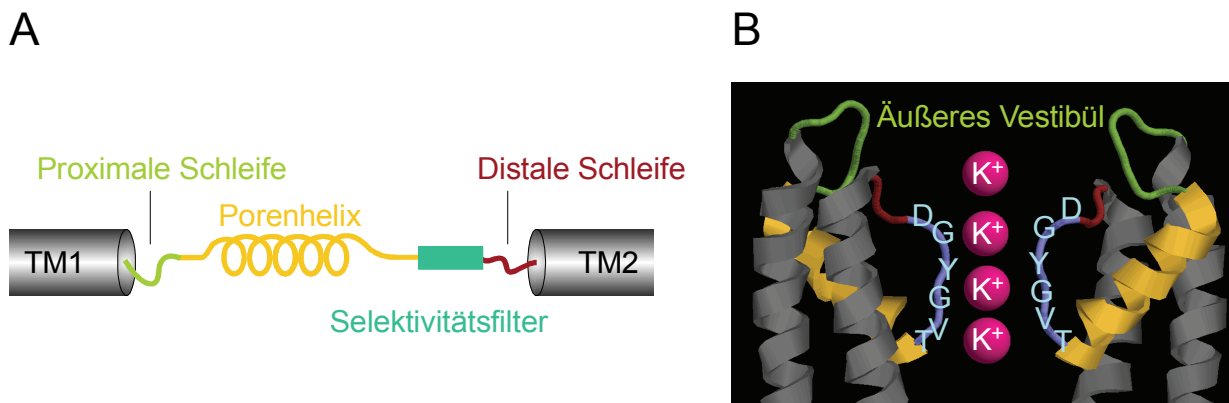


Abbildung 1.4: **Aufbau der Porenregion des bakteriellen  $K^+$ -Kanals (KcsA).** A: Topologie eines KcsA-Monomers zwischen den beiden Transmembrandomänen, basierend auf der Röntgenstruktur des Kanals (Doyle *et al.*, 1998). B: Dreidimensionale Struktur der Porenregion von KcsA (Datenbank-Nummer: 1R3I). Die Bereiche sind wie in A eingefärbt. Gezeigt sind zwei der vier Monomere, die einen funktionellen Kanal bilden. Die Aminosäuren des Selektivitätsfilters sind im Ein-Buchstaben-Code eingezeichnet. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten ist auch bei TRP-Kanälen eine ähnliche Struktur der Porenregion wahrscheinlich.

keine Röntgenstruktur verfügbar (Owsianik *et al.*, 2005). Aufgrund klarer Sequenzähnlichkeiten zu Kaliumkanälen ist eine ähnliche dreidimensionale Struktur der Kanäle jedoch sehr wahrscheinlich. Somit besteht die Porenregion von TRP-Kanälen vermutlich ebenfalls aus einem äußeren Vestibül, einer Porenhelix, dem Selektivitätsfilter und einer distalen Schleife. Molekulare Determinanten der Permeabilität von TRP-Kanälen wurden in zahlreichen Studien hauptsächlich mit Hilfe von *Patch-Clamp*-Messungen an Wildtyp- und Mutantenkanälen im Überexpressionssystem ermittelt. Die umfangreichsten Informationen sind bisher zur Permeation durch TRPV-Kanäle verfügbar. TRPV1-4 sind sowohl für mono- als auch divalente Kationen permeabel (Benham *et al.*, 1987, Gunthorpe *et al.*, 2002,

Voets et al., 2002, Voets & Nilius, 2003). Im Gegensatz dazu sind TRPV5 und TRPV6 hoch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 100$ ) und leiten nur in Abwesenheit divalenter Kationen nennenswerte, durch monovalente Kationenspezies getragene Ströme. Die monovalenten Ströme durch TRPV5 und TRPV6 werden durch mikromolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) blockiert, und erst mit steigenden  $[\text{Ca}^{2+}]$  (im millimolaren Bereich) beginnen diese Kanäle,  $\text{Ca}^{2+}$  zu leiten. Dieses funktionelle Charakteristikum teilen TRPV5/6 neben ihrer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität mit  $\text{Ca}_v\text{s}$ . Innerhalb der Pore von TRPV5 (D542) und TRPV6 (D541) ist außerdem, wie in  $\text{Ca}_v\text{s}$ , jeweils ein Ring aus sauren Aminosäuren für die hohe Permeabilität der Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$  und anderer divalenter Ionenspezies verantwortlich (Nilius et al., 2001). TRPV1-4 besitzen innerhalb ihrer mutmaßlichen Porenregion ein konserviertes Motiv („GMGD“ in TRPV1 und TRPV4, „GMDE“ in TRPV2 und „GLGD“ in TRPV3), das zum Selektivitätsfilter aus KcsA („GYGD“) starke Ähnlichkeiten aufweist (Owsianik et al., 2005). Aufgrund seiner analogen Position gehört es möglicherweise zum Selektivitätsfilter dieser Kanäle. Funktionell unterstützt wird diese These durch Mutationsanalysen an TRPV1 (D646N, Garcia-Martinez et al., 2000) und TRPV4 (D682A, Voets et al., 2002). Die Neutralisation des Aspartatrests führte jeweils zu einer Verminderung der Permeabilität dieser Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . In TRPV4 reduziert eine Mutation an einer Aminosäure außerhalb des konservierten Motivs (D672A) zusätzlich die Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und verringert die elektrische Feldstärke des Selektivitätsfilters (Voets et al., 2002).

TRPC-Kanäle sind, wie die meisten anderen TRP-Kanäle, Kationenkanäle, die relativ unselektiv sowohl mono- als auch divalente Kationen leiten und relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilitäten ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ) zwischen 1 und 10 aufweisen (Owsianik et al., 2005). Über die molekularen Details der Ionenpermeation durch TRPC-Kanäle ist zurzeit jedoch nur wenig bekannt. Die Analyse funktioneller Daten dieser Kanäle ist aufgrund der vielen Artefakte, die durch zahlreiche endogene speicher- und/oder PLC-abhängig regulierte Kanäle hervorgerufen werden, oft sehr komplex und führte in der Vergangenheit zu widersprüchlichen Ergebnissen. Aus solchen Gründen sind z.B. die Gruppe-4-TRPC-Kanäle einerseits als  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv (Philipp et al., 1998a, Warnat et al., 1999), andererseits als unselektiv, aber  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel (Philipp et al., 1996a, Okada et al., 1998, Schaefer et al., 2000) klassifiziert worden. Die Mitglieder der TRPC-Subfamilie weisen nur sehr schwache Sequenzähnlichkeiten mit umfangreicher analysierten Kanälen wie z.B.  $\text{K}_v\text{s}$  oder  $\text{Ca}_v\text{s}$  auf. Daher ist eine Prognose über die Lage ihres Selektivitätsfilters schwer zu stellen. Erste Hinweise auf Bindungsstellen für Kationen innerhalb der Porenregion von TRPC-Kanälen wurden in einer Studie an TRPC1 gefunden. Die Neutralisation aller negativ geladenen Aminosäuren zwischen TM5 und TM6 führte hier zu einer signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials und einer Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (Liu et al., 2003). Dieser Effekt konnte mit der Einzelmutation D581K reproduziert

werden. Bei TRPC5 ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität erhöht, wenn die zwei Glutamatreste aus einem EFTE-Motiv nahe TM6 neutralisiert werden (Jung *et al.*, 2003). Der  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Block von TRPC4 und TRPC5 bei positiven Potentialen, welcher für deren charakteristische, doppelt-rektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung (I-V) verantwortlich ist, wird hingegen zu großen Teilen durch Aspartatreste (D633), die distal von TM6 und damit außerhalb der mutmaßlichen Porenregion lokalisiert sind, determiniert (Obukhov & Nowycky, 2005).

In Melastatin-verwandten TRP-Kanälen weisen die putativen Porenregionen zwischen TM5 und TM6 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit auf. Erstaunlicherweise sind die Ströme durch TRPM-Kanäle jedoch sehr unterschiedlich hinsichtlich ihrer relativen Selektivitäten gegenüber Kationen (für ein Review siehe Owsianik *et al.*, 2005). Während TRPM4 und TRPM5 die einzigen TRP-Kanäle sind, durch die lediglich monovalente Ionenspezies permeieren, zeigen TRPM6 und TRPM7 eine deutliche Präferenz für divalente Kationen. TRPM2, TRPM3 und TRPM8 sind unselektiv und  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel. Einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Permeationseigenschaften liefern vier negativ geladene Aminosäuren (Aspartat oder Glutamat) nahe TM6, die innerhalb der TRPM-Familie teilweise oder vollständig konserviert sind (Owsianik *et al.*, 2005). Nilius *et al.* (2005a) tauschten in TRPM4 ein sechs Aminosäuren langes Motiv, welches drei der konservierten Aminosäuren (TRPM4 -D981, -D982 und -D984) enthält, gegen den Selektivitätsfilter von TRPV6 aus. Dies erzeugte einen funktionellen,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanal, der wie TRPV6 durch extrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  blockiert wird, dessen Regulation sich jedoch nicht vom TRPM4-Wildtyp unterschied. Einzelmutationen an den vier (semi-) konservierten Stellen in TRPM4 änderten entweder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität (Q977E), den Block durch Spermin (D981N) oder führten zur teilweisen (D982N) bzw. vollständigen (D984N) Destabilisierung der Pore. Auch in TRPM2, TRPM6, TRPM7 und TRPM8 führten Mutationen an den analogen Aminosäuren zur Veränderung der Permeationseigenschaften der Kanäle (Li *et al.*, 2007, Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Dabei war die Präsenz eines negativ geladenen Rest an der ersten Stelle (TRPM2-Q981E, TRPM6-E1024, TRPM7-E1047, TRPM8-Q981E) jeweils mit einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität der betroffenen Kanäle verbunden. Eine neutrale Aminosäure an gleicher Stelle brachte hingegen eine kleinere Permeabilität für divalente Kationen mit sich. Die jeweils zweiten konservierten Aminosäuren in TRPM6 (E1029) und TRPM7 (E1052) sind ebenfalls an der Permeation divalenter Kationen durch diese Kanäle beteiligt. Die Porenregion von TRPM-Kanälen scheint somit bei allen Mitgliedern dieser Subfamilie einen ähnlichen Aufbau zu haben, mit Veränderungen lediglich an funktionell relevanten Stellen. Diese Tatsache führte in einer kürzlich erschienenen Studie zur Entwicklung eines Stammbaumes, der die evolutionäre Entstehungsgeschichte der TRPM-Permeation wiedergibt (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008).



## 1.4. Zielsetzung der Doktorarbeit

Mitglieder der Familie der TRP-Kanäle sind in nahezu allen eukaryontischen Zellen vorhanden (Garcia & Schilling, 1997) und maßgeblich an zahlreichen zellulären und physiologischen Prozessen wie z.B. der Temperaturempfindung oder der trigeminalen Geschmackswahrnehmung beteiligt (Venkatachalam & Montell, 2007). Die experimentelle Identifikation der molekularen Korrelate solcher Vorgänge beruht im Fall von Ionenkanälen meist auf einem Vergleich von charakteristischen Informationen des Kanals, die im Überexpressionssystem ermittelt wurden, mit *in vivo* oder an nativen Zellen gewonnenen Daten. TRP-Kanäle sind seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung, und das Wissen über ihre Charakteristika und ihre biologischen Funktionen vergrößert sich beinahe täglich. Jedoch konzentrieren sich die meisten Studien auf Kanäle der TRPM-, der TRPV-Familie oder auf TRPA1. Obwohl die Mitglieder der TRPC-Subfamilie zu den ersten klonierten Vertretern der Mammalia-TRP-Kanäle gehörten, sind sie im Moment auf funktioneller Ebene die am wenigsten untersuchten TRP-Kanäle. Die vorliegende Arbeit wurde daher mit dem Ziel konzipiert, die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle der TRPC-Subfamilie im Detail zu studieren. Mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken und der *Patch-Clamp*-Methode sollte hierbei der Schwerpunkt auf die Untersuchung von TRPC5 gelegt werden. Der erste Teil dieser Doktorarbeit widmet sich der Fragestellung, ob Ströme durch TRPC-Kanäle, ebenso wie bei anderen TRP-Kanälen (siehe Kap. 1.3.1), spannungsabhängige Eigenschaften aufweisen, und ob diese sich möglicherweise während der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Kanäle verändern. Im zweiten Teil soll untersucht werden, welchen Einfluss extrazelluläre  $H^+$  auf Ströme durch TRPC5 haben. Ein Sequenzvergleich der Regionen zwischen TM5 und TM6 zeigt, dass in TRPC5 (E543, E595) und TRPV1 (E600, E648) Glutamatreste an ähnlichen Positionen lokalisiert sind. In TRPV1 sind diese an der Potenzierung und Aktivierung des Kanals durch  $H^+$  sowie Lanthanoide und Metallionen beteiligt (Jordt *et al.*, 2000, Ahern *et al.*, 2005, Tousova *et al.*, 2005). Bei TRPC5 wurden die Glutamatreste E543 und E595 bereits als Determinanten der Potenzierung durch Lanthanoide identifiziert (Jung *et al.*, 2003). Dies wirft die Frage auf, ob Ströme durch TRPC5 auch durch den extrazellulären pH-Wert modulierbar sind. Eine der am wenigsten untersuchten Fragestellungen ist die Ionenpermeation durch TRPC-Kanäle. Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit soll diese erstmals für TRPC-Kanäle umfassend charakterisiert werden. Mit gezielten Punktmutationen sollen außerdem Einblicke in den funktionellen Aufbau der Porenregion von TRPC5 gewonnen werden. Die Resultate dieser Doktorarbeit sollen ein besseres Verständnis von der Permeation und Regulation von TRPC-Kanälen vermitteln und dabei helfen, Ströme durch TRPC-Kanäle in zukünftigen Studien an nativen Zellen besser identifizieren zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologie

#### 2.1.1. Lösungen und Enzyme

Sofern nicht gesondert erwähnt, wurden sämtliche Verbrauchskemikalien in den unten aufgeführten Lösungen von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Für alle Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Optipure Analytical-Anlage (MembraPur GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet. Die pH-Werte wurden mithilfe eines InoLab<sup>®</sup> pH 720 - pH-Meters (WTW, Weilheim, Deutschland) eingestellt. Restriktions- und Ligationsenzyme sowie die dazugehörigen Puffer-Stocklösungen stammten von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Es handelte sich um konventionelle Enzyme in Konzentrationen von 10 bis 50 u/µl.

##### 2.1.1.1. Bakterienanzucht

LB-Medium (flüssig)

NaCl (Roth)	10 g
Peptone	10 g
<i>Yeast Extract</i>	5 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Das fertige LB-Medium wurde jeweils kurz nach der Herstellung autoklaviert. Die Zugabe der Selektionsmittel Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) erfolgte kurz vor der Bakterienanzucht.

LB-Medium (Agar)

NaCl (Roth)	10 g
Peptone	10 g
<i>Yeast Extract</i>	5 g
Agar	20 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Das fertige LB-Agar wurde jeweils kurz nach der Herstellung autoklaviert. Die Zugabe der Selektionsmittel Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) erfolgte im Anschluss an das Autoklavieren, nachdem die Lösung ca. auf 55°C abgekühlt war. Das mit Selektionsmedium versehene LB-Agar wurde danach in 92 mm-Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegossen (jeweils 20 ml pro Schale).

**2.1.1.2. DNA-Präparation**

## Puffer I

Glucose	4,5 g
Tris-Acetat	1,5 g
EDTA	1,86 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Puffer I wurde nach Herstellung mit HCl auf pH 8.0 titriert. Danach wurden 100 µg/ml RNase A (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) hinzugefügt.

## Puffer II

NaOH	4 g
SDS	5 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

## Puffer III

Kalium-Acetat	147,2 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Puffer III wurde nach Herstellung mit Essigsäure (96%) auf pH 5.5 titriert.

**2.1.1.3. Agarose-Gelelektrophorese**

## TAE-Puffer

Tris-Acetat	12,50 g
EDTA	0,37 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Der TAE-Puffer wurde nach Herstellung mit HCl auf pH 8.0 titriert.

## Agarosegel (1%)

Agarose	1 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Die Lösung wurde aufgeköcht, nach kurzem Abkühlen mit 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in eine Gelkammer (Eigenbau) gegossen, wo sie nach ca. 30 min erstarrte.

## Probenauftragspuffer

Glycerin	7,5 ml
Bromphenolblau	0,01 g
<hr/>	
TAE-Puffer	ad 100 ml

## 2.1.2. Plasmide und cDNAs

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide waren pcDNA3, pEGFP-N1 (beide Clontech, Palo Alto, USA) und pIRES2-EGFP (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland). Der Vektor pcDNA3-YFP-fusion wurde von Dr. M. Schaefer hergestellt (Schaefer *et al.*, 2001). Bis auf pIRES2-EGFP, welcher ein Kanamycin-Resistenzgen beinhaltet, besitzen alle diese Vektoren ein Resistenzgen für Ampicillin. In der nachstehenden Tabelle sind die cDNAs aufgelistet, die zu Beginn der vorliegenden Arbeit vorhanden waren, sowie deren Zugangsnummern (RefNum) und die umgebenden Plasmide. Außer den oben genannten cDNAs waren die TRPC5-Mutanten E543Q, E570Q sowie E595Q/E598Q im pcDNA3-YFP-fusion-Vektor (Jung *et al.*, 2003) vorhanden.

Tabelle 2.1: **Vorhandene cDNAs, ihre Genebank-Zugangsnummern und Hostplasmide.**

cDNA	RefNum	Plasmid	Literatur / Herkunft
hTRPC3	NM_003305	pIRES2-EGFP	Zitt et al., 1997
hTRPC4 $\beta$	AF421359	pcDNA3 pcDNA3 -YFP-Fusion	Schaefer et al., 2000
mTRPC5	NM_009428	pIRES2-EGFP pcDNA3-YFP-fusion pcDNA3.1/V5 His-TOPO	Schaefer et al., 2000
hTRPC6	NM_004621	pIRES2-EGFP	Hofmann et al., 1999
mTRPV4	NM_022017	pEGFP-N1	Strotmann et al., 2000
rH1R	NM_017018	pcDNA3	Jung et al., 2003

## 2.1.3. Qualitätskontrollen der DNA

### 2.1.3.1. DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen

DNA-Restriktionsverdau (Testrestriktionen) wurden in einem Volumen von 20  $\mu$ l durchgeführt. Ein Ansatz enthielt neben ddH<sub>2</sub>O jeweils ca. 2  $\mu$ g Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) empfohlenen und gelieferten Reaktionspuffer und 0,5  $\mu$ l Enzym. Testrestriktionen wurden üblicherweise für 1 h bei 37°C inkubiert. Die korrekte Länge der DNA-Fragmente wurde anschließend mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft (30 min, 100 mV, Abb. 2.1). DNA-Restriktionsverdau zu präparativen Zwecken (Klonierung) werden in Kapitel 2.1.6.1 gesondert beschrieben.

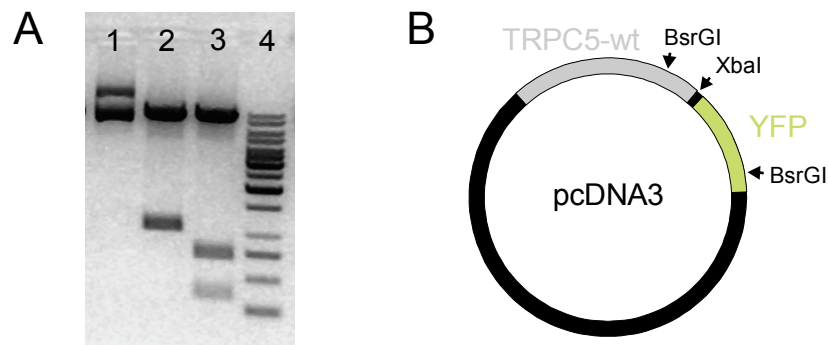


Abb. 2.1: **Testrestriktion von TRPC5-wt-YFP-pcDNA3.** A: 1, Ungeschnitten. 2, BsrGI. 3, BsrGI und XbaI. 4, 1kB-DNA-Leiter (Fermentas). B: Schematische Darstellung des geschnittenen Vektors. XbaI schneidet an Position 984 in pcDNA3 (kurz hinter dem TRPC5-Gen) und BsrGI an Position 1480 im TRPC5-Gen sowie an Position 721 im YFP-Gen. Dadurch ergaben sich im abgebildeten Gel (A) in Spur 2 zwei Fragmente (ein langes, ein kurzes), wobei das kurze Fragment in Spur 3 durch XbaI weiter fragmentiert wurde.

### 2.1.3.2. DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden bei SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland) in Auftrag gegeben. Entsprechend den Vorgaben für eine *Extended HotShot*-Sequenzierung bestand ein Ansatz aus 0,6-0,7 µg Plasmid-DNA und 20 pmol Sequenzierungs-Primer (Tab.2.2), aufgefüllt auf 7 µl (ddH<sub>2</sub>O). Die Primer wurden so geplant, dass eine lückenlose Sequenzierung der TRPC5-cDNA möglich war.

Tabelle 2.2: **Primer für die Sequenzierung von TRPC5.** Mit einer Extended HotShot wurden 800-900 Basen sequenziert. Rechts sind die Positionen der TRPC5-cDNA angegeben, zu denen der entsprechende Primer komplementär ist. Der T7-Promotor ist eine DNA-Sequenz, die in allen verwendeten Vektoren kurz von der TRPC5-cDNA lokalisiert ist.

Nr.	Sequenz	Komplementär zu
1	5'-TAATACGAGTCACTATAGGGA-3'	T7
2	5'-CTCAAGGAGCTGAGCAAAGTG-3'	679-699
3	5'-TGCAGAAGCACTCTTCGCAATATC-3'	1431-1454
4	5'-CAGAACGTCATGCTGACAGC-3'	2099-2118
5	5'-CGCTATTCTCAGATGGAGAAAGGG-3'	2647-2670

## 2.1.4. Plasmidamplifikation

### 2.1.4.1. Transformation

Plasmid-DNA wurde für die Amplifikation zunächst in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E.coli* (DH5α, zur Verfügung gestellt von Dr. O. Pinkenburg, Marburg) transformiert. Die in 100 µl-Aliquots bei -80°C gelagerten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut (ca. 2 min) und anschließend mit 1 µl Plasmid-DNA versehen. Nach einer Inkubation

von 30 min auf Eis wurde der Ansatz für 30 s auf 42°C erhitzt („Hitzeschock“) und anschließend nochmals für mindestens 2 min auf Eis gestellt. Der Ausstrich der Bakterien, die mit einem Ampicillin-resistenten Plasmid transformiert wurden, auf LB-Agar-Platten erfolgte direkt im Anschluss, während mit pIRES2-Plasmiden (Kanamycin-Resistenz) transformierte Bakterien in 1 ml LB-Medium bei 37°C für 1h inkubiert wurden, bevor sie auf LB-Platten ausgestrichen wurden. Die auf den Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden über Nacht (ca.12 - 16h) bei 37°C inkubiert und bildeten dabei punktförmige Kolonien, welche auf monoklonale *E.coli*-Stämme, die das transformierte Plasmid in großer Menge enthalten, zurückzuführen sind. Je nach gewünschter DNA-Ausbeute wurden anschließend kleine (Mini, 0,1 bis 1 µg/µl Ausbeute) oder mittlere (Midi, 1,5 bis 12 µg/µl Ausbeute) Präparationen durchgeführt.

#### **2.1.4.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Für eine Mini-Präparation wurden einzelne Kolonien von den LB-Agar-Platten mit sterilen Pipettenspitzen jeweils in 2 ml LB-Medium (inklusive dem jeweiligen Selektionsmittel) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl Puffer I (siehe Kap. 2.1.1.2) aufgenommen. Die Zugabe von 200 µl Puffer II führte zur alkalischen Lyse der Bakterien, und die Zugabe von Puffer III zur Neutralisation des Ansatzes, die das Ausfällen der meisten Proteine zur Folge hatte. Nach einer ausgedehnten Zentrifugation (mind. 30 min, 13000 rpm) wurde der Überstand (ca. 450 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 900 µl Ethanol (96%), 10 min Inkubation bei -80°C und anschließender Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurde die in Lösung befindliche DNA pelletiert. Es folgten einmal Waschen (Überschichtung des Pellets mit 1 ml 70% Ethanol und Zentrifugation 5 min 13000 rpm) und die Trocknung des Pellets, bevor es in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. Die DNA-Konzentration wurde nach jeder Mini-Präparation bestimmt und lag jeweils zwischen 0,1 und 1 µg/µl.

#### **2.1.4.3. Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Für eine Midi-Präparation wurden einzelne Kolonien von den LB-Agar-Platten mit sterilen Pipettenspitzen jeweils in 200 µl LB-Medium (inklusive dem jeweiligen Selektionsmittel) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Präparation wurde mit NucleoBond Xtra Midi - Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt, welche auf ähnlichen Prinzipien wie die Mini-Präparation beruht, aber zur Aufreinigung der DNA eine Affinitätssäule verwendet. Die Prozedur wurde jeweils nach den Angaben im Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde nach einer Midi-Präparation bestimmt und betrug etwa 1,5 bis 12 µg/µl.

### 2.1.5. Einführung von Punktmutationen

Die Punktmutationen, welche in Tabelle 2.3 aufgelistet sind, wurden mit Hilfe des QuikChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) in die cDNA von TRPC5 eingeführt. Die Methode beruht auf der Aktivität der thermophilen *PfuTurbo*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase, welche mit hoher Genauigkeit DNA-Stränge repliziert, ohne dabei die verwendeten Primer abzulösen. Ausgangspunkt waren jeweils Plasmide, die die Wildtyp-cDNA von TRPC5 trugen. Es wurde pro Mutante ein Paar (vorwärts, rückwärts) Primer geplant, welches homolog zum sense- und antisense-Strang von *trpc5* war und die gewünschte Mutation beinhaltete (Tab. 2.3). Für die Synthese der mit DNASTAR (Lasergene, Madison, USA) geplanten Primer wurde die Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) beauftragt. Ein Mutageneseansatz hatte abweichend vom Herstellerprotokoll ein Volumen von 25 µl (statt 50 µl) und bestand jeweils aus ddH<sub>2</sub>O (17,5 µl), 10X reaction buffer (2,5 µl), QuikSolution (1,5 µl), dNTP-Mix (1 µl) sowie TRPC5-wt-DNA (0,5 µl aus 10 ng/µl-Stock), Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer (je 1 µl aus einem 10 µM-Stock) und 0,5 µl *PfuTurbo*<sup>®</sup>. Die Replikation des gesamten Plasmids (das die TRPC5-wt-cDNA trug) wurde ähnlich wie bei einer PCR über die Temperatur gesteuert, mit mehreren Zyklen (18), die aus jeweils einem Schritt zum Schmelzen der DNA (50 s, 95°C), zum Primerannealing (50 s, 60°C) und zur Elongation der Tochterstränge (18 min, 68°C) bestanden. Anders als

Tabelle 2.3: In die cDNA von TRPC5-wt eingeführte Punktmutationen und dafür verwendete Primer (in 5'-3'-Richtung). Mit den Basen ist die Position der zu den Primern homologen Sequenzen im TRPC5-Gen angegeben. Die fett gedruckten Triplettts kennzeichnen das Codon der mutierten Aminosäure, in rot ist jeweils die ausgetauschte Base markiert.

Mutation	Basen	Primer
D548N	1623-1665	CTATGAGACCAGAGCTATT <b>AAT</b> GAACCTAACAACCTGCAAGGGG CCCCTTGCAGTTGTTAGGTT <b>ATT</b> AATAGCTCTGGTCTCATAG
E549Q	1623-1665	CTATGAGACCAGAGCTATTGAT <b>CAAC</b> CTAACAACCTGCAAGGGG CCCCTTGCAGTTGTTAGGTT <b>GAT</b> CAATAGCTCTGGTCTCATAG
E559Q	1656-1698	CTGCAAGGGGATCCGATGT <b>CAAAA</b> ACAGAACAACGCCTTCTCC GGAGAAGGCGTTGTTCTGTTTT <b>G</b> ACATCGGATCCCCTTGCAG
N584D	1730-1770	GGTCTGTCTTTGGCCTCCTA <b>GAT</b> CTCTATGTTACCAATGTG CACATTGGTAACATAGAG <b>ATC</b> TAGGAGGCCAAAGACAGACC
H594L	1763-1804	CCAATGTGAAGGCCCG <b>ACTTT</b> GAGTTCACTGAGTTTGTGGGAG TCCCACAAACTCAGTGA <b>ACTCAAG</b> TCGGGCCTTCACATTGG
E595Q	1763-1804	CCAATGTGAAGGCCCGACAT <b>CAG</b> TTCACTGAGTTTGTGGGAG CTCCCACAAACTCAGTGA <b>ACTGAT</b> GTCGGGCCTTCACATTGG
E598Q	1770-1812	GAAGGCCCGACATGAGTTCACT <b>CAG</b> TTTTGTGGGAGCTACGATG CATCGTAGCTCCCACAA <b>ACTG</b> AGTGA <b>ACT</b> CATGTCGGGCCTTC

bei einer PCR kommt es bei dieser Form der Replikation jedoch nicht zu einer Amplifikation des Template-Plasmids, da nach erfolgter Elongation der Tochterstrang zwischen dem 5'- und das 3'-Ende unterbrochen ist und somit auch in den Folgezyklen nur das ursprüngliche Template (Plasmid mit TRPC5-wt-cDNA) repliziert werden kann. Nach erfolgter temperaturgesteuerter Replikation wurde die Template-DNA, welche aufgrund der Amplifikation in DH5 $\alpha$ -Stämmen (dam<sup>+</sup>) methyliert war, durch die Zugabe von 0,5  $\mu$ l DpnI und Inkubation bei 37°C (2h) selektiv aus dem Reaktionsansatz eliminiert. Die so „gereinigten“ Ansätze, welche nur noch Vektoren mit der Punktmutation beinhalten sollten, wurden komplett (d.h. 25  $\mu$ l) in E.coli transformiert und mit einer Mini-Präparation aufgereinigt (siehe Kap. 2.1.4.2). Die korrekte Einführung der Punktmutationen wurde jeweils mittels Sequenzierung mit Primer Nr. 3 sichergestellt.

Für die Herstellung der TRPC5-Mutanten D548N, E549Q, E595Q und E598Q wurde TRPC5-wt im Vektor pcDNA3.1/V5 His-TOPO als Template-DNA verwendet, für die Herstellung von E559Q, N548D, H594L und D633N TRPC5-wt-pIRES2-EGFP. Die Doppelmutante TRPC5-E543Q/E595Q wurde mit TRPC5-E543Q-YFP-pcDNA3 als Template und den Primern für E595Q hergestellt.

## 2.1.6. Molekulare Klonierung

Bei der molekularen Klonierung wird durch einen präparativen DNA-Verdau ein DNA-Fragment aus einem Plasmid herausgeschnitten und mit einem anderen, linearisierten Vektor ligiert. Obwohl sich die Klonierungsstrategien in Bezug auf die verwendeten Restriktionsenzyme von Fall zu Fall unterschieden, war die generelle Prozedur immer dieselbe.

### 2.1.6.1. Präparativer DNA-Verdau

Die Prinzipien der präparativen Restriktion sind die gleichen wie die der Testrestriktionen (siehe Kap. 2.1.3.1), jedoch werden hier größere Mengen an DNA eingesetzt, um mehr Ausgangsmaterial für die Ligation zu erhalten. Ein Restriktionsansatz enthielt 10  $\mu$ g Plasmid-DNA, 5  $\mu$ l vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) empfohlenen und gelieferten Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l vom jeweiligen Enzym (meist zwei verschiedene Enzyme pro Ansatz) und hatte ein Endvolumen von 50  $\mu$ l (ddH<sub>2</sub>O). Bei allen Restriktionen mit Esp3I enthielt der Ansatz zusätzlich 1  $\mu$ l DTT (1%). Restriktionen mit der Enzymkombination SacII / SpeI mussten sequentiell durchgeführt werden, da keiner der von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) angebotenen Reaktionspuffer gleichzeitig die Aktivität beider Restriktionsenzyme sicherstellte. Beim sequentiellen Verdau wurde die DNA zunächst mit einem der Enzyme (SacII, Puffer *blau*, oben beschriebenes Protokoll) linearisiert, und nach Inkubation (2h, 37°C) durch Zugabe von 100  $\mu$ l Ethanol (96%)



und 15 µl Na-Acetat (pH 5,2) zum Ansatz ausgefällt. Nach Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol wurde dieses in einem Restriktionsansatz mit dem zweiten Enzym (SpeI, Puffer *gelb*, gemäß dem oben beschriebenen Protokoll) gelöst und für 2h bei 37°C inkubiert.

Bei präparativen Restriktionen, die ein linearisiertes Vektorfragment liefern sollten, wurden dem Ansatz nach dem Verdau 2 µl SAP zugefügt, um die 5'-Enden der DNA zu dephosphorylieren und somit eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern. Es folgten Inkubationen für 20 min bei 37°C (Dephosphorylierung) sowie für 20 min bei 65°C (Inaktivierung der SAP).

### 2.1.6.2. Gelelution

Die DNA-Fragmente aus der präparativen Restriktion (siehe Kap. 2.1.6.1) wurden 1:5 mit DNA-Probenpuffer gemischt und dann über ein 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt (ca. 45 min, 80 mV). Aufgrund des großen Volumens (50 µl) wurde ein Ansatz auf jeweils 2 Taschen im Gel aufgeteilt (Abb.2.2). Die DNA-Fragmente von Interesse wurden dann mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem *peqGOLD Gel Extraction Kit* (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gemäß den Herstellervorgaben. Die Fragmente wurden am Ende dieser Prozedur in 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

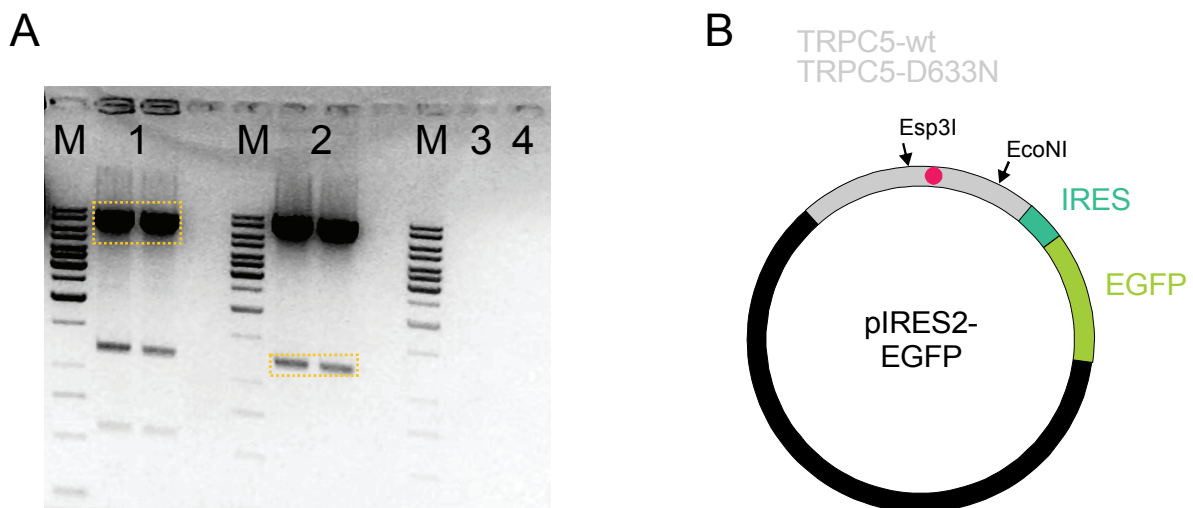


Abb. 2.2: **Präparative Restriktion von TRPC5-wt-IRES2-EGFP und TRPC5-D633N-IRES2-EGFP mit EcoNI und Esp3I.** A: Agarosegel mit den DNA-Fragmenten. M, 1kB-DNA-Leiter (Fermentas). 1, TRPC5-wt-IRES2-EGFP-Fragmente (VF). 2, TRPC5-D633N-IRES2-EGFP-Fragmente (IF). 3 und 4, Negativkontrollen, d.h. Ansatz mit EcoNI (3) oder Esp3I(4) ohne Plasmid-DNA. Gelb eingerahmt sind die Fragmente, die für die Gelelution ausgeschnitten wurden. B: Schematische Darstellung der geschnittenen Vektoren. Esp3I schneidet an Position 1481 und EcoNI an Position 2708 in der TRPC5-cDNA. Die Mutation G1897A, die auf Proteinlevel zu D633N führt, liegt zwischen den beiden Schnittstellen und ist mit einem roten Punkt gekennzeichnet.

### 2.1.6.3. Ligation

Bei der Ligation werden jeweils zwei doppelsträngige DNA-Moleküle mit passenden Überhängen durch eine Ligase zu einem Molekül kondensiert. Die im Rahmen der durchgeführten Klonierungen ligierten Vektorfragmente (VF) und Insertfragmente (IF) wurden, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, durch präparative Restriktion (siehe Kap. 2.1.6.1) generiert, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und schließlich durch Gelelektion aufgereinigt (siehe Kap. 2.1.6.2). Pro durchgeführter Ligation wurden jeweils zwei Ansätze vorbereitet, die entweder aus 2 µl VF und 6,5 µl IF oder aus 4 µl VF und 4,5 µl IF und zusätzlich 1 µl Ligasepuffer sowie 0,5 µl T4-Ligase bestanden. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und dann in *E.coli* transformiert.

### 2.1.7. Übersicht über die Herstellung der verwendeten Plasmide

Für die Untersuchung von TRPC5 und Mutanten war es einerseits zweckmäßig, die Proteine mit Fluoreszenzmarkern (YFP) zu koppeln, um ihre subzelluläre Lokalisation in der Nähe der Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüfen zu können. Andererseits sollten die Proteine getrennt vom Fluoreszenzmarker für die Patch-Clamp-Experimente exprimiert werden können. Daher wurden alle hergestellten Mutanten (siehe Kap. 2.1.5) sowohl in den pcDNA3-YFP-Fusion-Vektor (Schaefer *et al.*, 2001) als auch in den pIRES2-EGFP-Vektor (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) kloniert. Beim ersteren Konstrukt folgt auf die cDNA der jeweiligen Isoform ein YFP-Gen, was zur Expression von Kanaluntereinheiten führte, die C-terminal mit YFP fusioniert waren. Beim Einsatz des pIRES-Vektors wird hingegen eine bicistronische mRNA translatiert, von der die cDNA der zu untersuchenden Kanaluntereinheit und das egfp-Gen separat translatiert werden.

Die TRPC5-Mutanten D548N, E549Q, E595Q und E598Q wurden mit TRPC5-wt-pcDNA3.1/V5 His-TOPO als Template hergestellt (siehe Kap. 2.1.5). Die Klonierung in pIRES2-EGFP erfolgte über die präparative Restriktion mit SpeI/SacII (pcDNA3.1/V5 His-TOPO), bei der die gesamte cDNA inklusive Stoppcodon ausgeschnitten wurde, sowie NheI/SacII (pIRES2-EGFP) und anschließender Ligation. Die korrekten Sequenzen von TRPC5-D548N, TRPC5-E549Q, TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q wurden durch Sequenzierung mit den Primern Nr.1-5 lückenlos überprüft. Die Klonierung der vier Mutanten in den pcDNA3-YFP-Fusion-Vektor erfolgte durch Verdau von TRPC5-wt-pcDNA3-YFP-Fusion (VF) und der zuvor generierten pIRES2-EGFP-Vektoren, die diese TRPC5-Mutanten beinhalten (IF), jeweils mit Esp3I und EcoNI und anschließender Ligation. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung mit Primer Nr.3 (siehe Kap. 2.1.3.2) überprüft.

Für die Herstellung der Mutanten TRPC5-E559Q, TRPC5-N584D, TRPC5-H594L und TRPC5-D633N wurde TRPC5-wt-pIRES2-EGFP als Template verwendet, für die Doppelmutante TRPC5-E543Q/E595Q der Vektor TRPC5-E543Q-pIRES2-EGFP (und die Primer für E595Q, siehe Kap. 2.1.5). Um ein fehlerfreies Plasmid zu erhalten, wurden die Esp3I/EcoNI-Fragmente (IF, enthielten die Mutationen) dieser Vektoren in TRPC5-wt-pIRES2-EGFP (VF, Esp3I/EcoNI) subkloniert. Die Klonierung in pcDNA3-YFP-Fusion erfolgte durch Subklonierung der Esp3I/EcoNI-Fragmente von TRPC5-E559Q-, TRPC5-N584D-, TRPC5-H594L-, TRPC5-D633N- und TRPC5-E543Q/E595Q-pIRES2-EGFP (IF), in TRPC5-wt-pcDNA3-YFP-Fusion (VF, linearisiert mit Esp3I/EcoNI). Die cDNA der TRPC5-Mutante E570Q lag zu Beginn dieser Arbeit bereits im Vektor pcDNA3-YFP-Fusion vor und wurde mit Esp3I/EcoNI in TRPC5-wt-pIRES subkloniert. Alle mit Esp3I/EcoNI generierten Konstrukte wurden mit Primer Nr.3 (siehe Kap. 2.1.3.2) auf Richtigkeit überprüft.

## 2.2. Zellkultur und Transfektionen

### 2.2.1. Zellkultur von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> - Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 37°C unter befeuchteter Atmosphäre und 5% oder 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium, in dem HEK293-Zellen kultiviert wurden, war MEM *with Earle's salts* (*minimal essential medium*, PAA Laboratories, Linz, Österreich), ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (Invitrogen, Carlsbad, USA), 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide PAA Laboratories, Linz, Österreich). Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% bis 90% wurden diese mit einer 0,02% EDTA/ 0,05% Trypsin-Lösung (PAA Laboratories, Linz, Österreich) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und 10% der Zellen in eine neue Flasche eingesät. Für transiente Transfektionen wurden jeweils 3\*10<sup>5</sup> HEK293-Zellen in 35 mm-Kulturschalen (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) mit 1,5 ml Kulturmedium eingesät.

### 2.2.2. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Zwei Tage nach dem Einsäen der HEK293-Zellen wurden pro 35 mm-Kulturschale 2 µg des Vektors, der die cDNA der zu untersuchenden Kanaluntereinheit sowie einen Fluoreszenzmarker enthielt, mit Hilfe der Lipofektionsreagenzien FuGENE<sup>®</sup> 6, FuGENE<sup>®</sup> HD (beide Roche, Basel, Schweiz) oder TransIT<sup>®</sup> (Mirus Bio Corporation, Madison, USA) gemäß des jeweiligen Herstellerprotokolls transfiziert. Bei Transfektionen von Kanaluntereinheiten im Vektor pcDNA3,

welcher kein Gen für ein fluoreszierendes Protein enthält, wurden zusätzlich 50 ng EGFP (pEGFP, siehe Kap. 2.1.2) cotransfiziert. Für die Coexpression eines Kanals mit dem Histaminrezeptor (H<sub>1</sub>R) enthielt der Transfektionsansatz zusätzlich 100 ng der H<sub>1</sub>R-cDNA (im pcDNA3-Vektor, siehe Kap. 2.1.2).

### 2.2.3. Vorbereitung der Zellen für die Experimente

Für Patch-Clamp-Experimente im Ganzzellmodus wurden die HEK293-Zellen 1-2 Tage nach Transfektion entweder auf Glasplättchen (10 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) oder direkt in Nunc-Schalen (35 mm, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) umgesetzt. Die funktionelle Expression der transfizierten cDNAs in HEK293-Zellen war dabei auf beiden Oberflächen gleich. Für Experimente im *Outside-Out*-Modus wurde die Oberfläche der Nunc-Schalen vor dem Umsetzen mit Poly-L-Lysin (100 µg/ml) beschichtet, um eine gute Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. In Vorbereitung auf mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen 2 Tage nach Transfektion auf 25 mm-Glasplättchen umgesetzt (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland). Alle Experimente mit transfizierten HEK293-Zellen erfolgten am selben oder am Tag nach dem Umsetzen.

## 2.3. Konfokale Mikroskopie

Zur Kontrolle der Oberflächenexpression von TRPC5 und den hergestellten Mutanten wurden HEK293-Zellen, die die YFP-fusionierten Kanaluntereinheiten exprimieren, vorbereitet (siehe Kap. 2.2.1 und 2.2.2) und mit konfokaler Mikroskopie untersucht. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie wird hierbei das Licht, welches nicht aus der Fokalebene kommt, mit Hilfe zweier Lochblenden unterdrückt, was zu einer schärferen Abbildung des untersuchten Objekts führt. Die konfokalen und Differenz-Interferenz-Kontrast (DIC)-Aufnahmen in der vorliegenden Arbeit wurden an einem LSM510 META (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgezeichnet. Für die Detektion des C-terminal an die Kanaluntereinheiten gekoppelten YFP-Proteins wurde ein 63x/1.4 Plan-Apochromat Öl-Objektiv, eine Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Laser), sowie ein 505 nm Tiefpass-Filter verwendet. Der Durchmesser der Lochblende wurde so eingestellt (124 µm), dass eine Auflösung von 0,06 µm erzielt werden konnte.

Die Aufnahmen der Fluoreszenz- und DIC-Kanäle hatten jeweils eine Größe von 1024x1024 Pixeln (ca. 60 µm) und wurden mit Hilfe des Zeiss LSM Image Browsers (4.2.0.121, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland) jeweils

einzelnen als JPEG aus den mdb-Datenbanken exportiert. Die Überlagerung der Aufnahmen (DIC und YFP) erfolgte in Photoshop (10.0.1, Adobe, San Jose, USA) mit Hilfe der Ebenentransparenz-Funktion (50%). Um den Kontrast der DIC-Kanäle zu verbessern, wurde die automatische Tonwertkorrektur des Programms verwendet, und beim Fluoreszenzkanal wurden die Tiefenwerte bis 6% herausgefiltert, um die minimale Hintergrundfluoreszenz zu beseitigen.

## 2.4. Elektrophysiologie

### 2.4.1. Die Patch-Clamp-Technik

#### 2.4.1.1. Konfigurationen

Die erstmals 1976 von Sakmann und Neher beschriebene Patch-Clamp-Methode wurde ursprünglich für die Messung von sehr kleinen Strömen ( $\sim 1$  pA) durch Einzelkanäle konzipiert (Neher & Sakmann, 1976, Hamill *et al.*, 1981). Sie wird heutzutage jedoch auch für die Messung von Ganzzellströmen in kleinen Zellen genutzt. In Patch-Clamp-Messungen wird eine mit Elektrolytlösung gefüllte Mikropipette (Spitzendurchmesser ca.  $1 \mu\text{m}$ ) an die Zellmembran gepresst. Durch Anlegen eines Unterdruckes wird eine enge Verbindung zwischen der Pipette und dem von der Mikropipette eingeschlossenen Membranfleck (*Patch*) erzielt, was die elektrische Isolation des Patches von der umgebenden Badlösung zur Folge hat (**Cell-Attached-Modus**, Gigaohm-Seal). Der Widerstand zwischen der Lösung im Bad und in der Pipette beträgt in diesem Modus mehr als ein Gigaohm ( $G\Omega$ ), was auf die große Nähe ( $\sim 1$  nm) der Oberfläche der Glaspipette und der Zellmembran zurückzuführen ist, die durch Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und Van der Waals-Kräfte stabilisiert wird (Sakmann & Neher, 1983, Opsahl & Webb, 1994). Zwei Silber/Silberchlorid-Elektroden, eine im Bad, die andere in der Pipette, koppeln die beiden Elektrolytlösungen an einen elektrischen Stromkreis (siehe Kap. 2.4.1.2), mit dem die Ströme durch einzelne Ionenkanäle, die sich im *Patch* befinden, aufgezeichnet werden können. Eine Eigenschaft dieses **Cell-Attached-Modus** ist, dass das Zellinnere (Cytosol) weitestgehend unverändert bleibt, wodurch einerseits während einer Messung relativ „lebensechte“ intrazelluläre Bedingungen vorherrschen, andererseits die Zusammensetzung des Cytosols unbekannt ist. Durch den fehlenden elektrischen Zugriff auf das Zellinnere kann die Zelle nicht auf ein definiertes Membranpotential geklemmt werden.

Wegen der hohen mechanischen Belastbarkeit des Gigaohm-Seals können drei weitere Patch-Clamp-Konfigurationen erzielt werden. Bewegt man die Mikropipette im **Cell-Attached-Modus** von der Zellmembran fort, wird der Membranfleck in der Pipette von der Zelle abgezogen, und seine vormals intrazelluläre Seite ist nun zur

Badlösung gerichtet (**Inside-Out**). In dieser Konfiguration können daher (im Gegensatz zum *Cell-Attached*-Modus) Einzelkanalströme unter definierten Bedingungen auf beiden Seiten der Membran untersucht werden. Da für gewöhnlich die Badlösung leicht austauschbar ist, werden Messungen im *Inside-Out*-Modus oft dafür benutzt, um die Effizienz intrazellulärer Regulatoren von Ionenkanälen zu testen. Der Ganzzell- (oder **Whole-Cell**-) Modus wird durch die Applikation eines starken Unterdrucks auf die Patch-Pipette in der *Cell-Attached*-Konfiguration erreicht. Dadurch wird der Membranfleck zerstört und man erlangt über die Elektrode in der Pipette einen elektrischen Zugriff mit geringem Widerstand (idealerweise  $< 10 \text{ M}\Omega$ ) auf das Zellinnere. Das intrazelluläre Milieu wird durch die Elektrolytlösung in der Pipette passiv per Diffusion ausgetauscht. Dies führt zu definierten Bedingungen in Bezug auf die Zusammensetzung der Lösungen, sowohl extra- als auch intrazellulär. Im Ganzzell-Modus können für gewöhnlich keine Einzelkanalströme aufgelöst werden, vielmehr wird die kumulative Aktivität aller offenen Ionenkanäle in der gesamten Zellmembran (Ganzzellstrom) gemessen. Sollen Einzelkanalströme unter verschiedenen Konditionen auf der extrazellulären Seite der Membran untersucht werden, wird der **Outside-Out**-Modus verwendet. Diesen erreicht man durch Abziehen der Mikropipette im Ganzzell-Modus von der Zellmembran, was zu einem Patch führt, dessen extrazelluläre Seite zur Badlösung gerichtet ist.

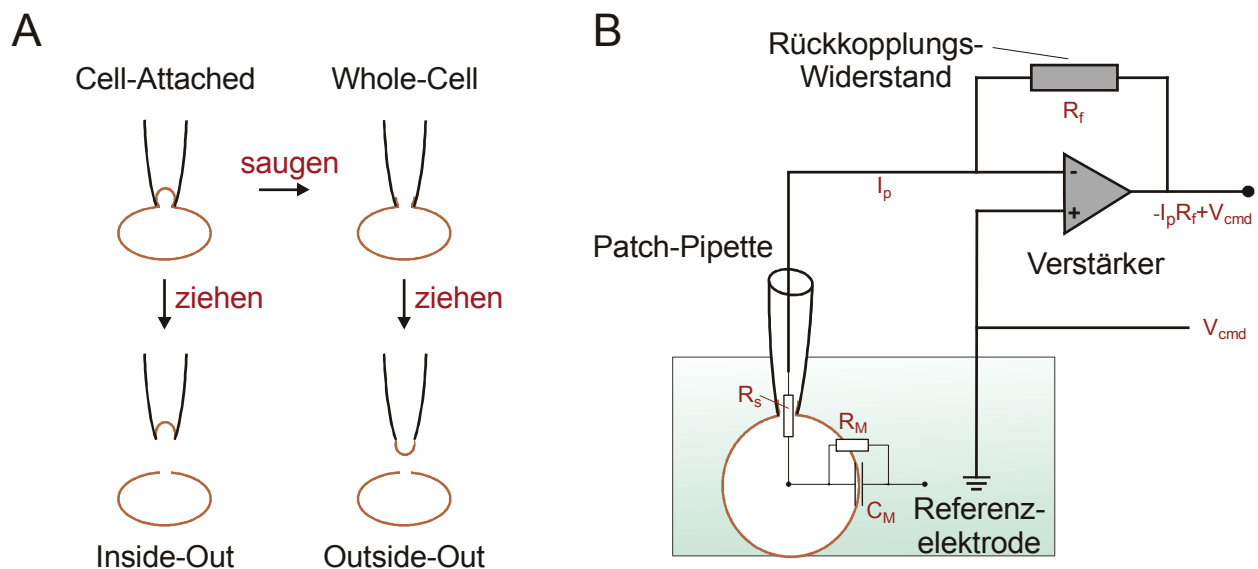


Abb. 2.3: **Patch-Clamp-Technik.** A: Patch-Clamp-Konfigurationen. B: Vereinfachtes Schaltbild des Patch-Clamp-Stromkreises. Die roten Symbole geben die physikalischen Kenngrößen des Stromkreises wieder.  $R_f$ , Rückkopplungswiderstand.  $V_{cmd}$ , Sollspannung.  $I_p$ , über die Pipette injizierter Strom.  $R_s$ , Serienwiderstand.  $R_M$ , elektrischer Widerstand der Zellmembran.  $C_M$ , Membrankapazität.

### 2.4.1.2. Der Patch-Clamp-Stromkreis

Der Patch-Clamp-Stromkreis besteht im Wesentlichen aus vier Komponenten, der Pipettenelektrode, der Bad- oder Referenzelektrode und dem Patch-Clamp-Verstärker mit dem Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ , Abb. 2.3 B). Der invertierende Eingang des Verstärkers (-) ist mit der Pipettenelektrode verbunden, der nichtinvertierende Eingang (+) mit einer variablen Spannungsquelle, über die ein Sollwert ( $V_{cmd}$ ) angelegt wird. Wenn Ionenströme, z.B. nach Gabe eines Agonisten, über die Zellmembran fließen, führt dies zu einer Abweichung der Ist-Spannung (zwischen der Elektrode im Bad und in der Pipette) von  $V_{cmd}$ , welche durch Injektion eines entgegen gerichteten Stroms in die Zelle kompensiert wird. Auf diese Weise wird das Membranpotential wieder auf  $V_{cmd}$  geklemmt und gleichzeitig der Strom durch den Patch in Form des Spannungsabfalls über  $R_f$  gemessen. Über einen AD-Wandler gelangen die Signale ins Messprogramm, wo sie verarbeitet und protokolliert werden. Analog zur eben beschriebenen „Spannungsklemme“ (*Voltage Clamp*), bei der man das Membranpotential konstant hält ( $V_{cmd}$ ) und die Ströme durch Ionenkanäle misst, kann auch das Membranpotential determiniert werden, wenn der Membranstrom geklemmt wird (*Current Clamp*). Die in dieser Arbeit vorgestellten Patch-Clamp-Messungen wurden jedoch alle im *Voltage-Clamp*-Modus durchgeführt.

### 2.4.1.3. Potentiale zwischen Pipetten- und Badelektrode

#### 2.4.1.3.1. Offset und Junction-Potentiale

Patch-Clamp-Messungen im *Voltage-Clamp*-Modus werden mit dem im vorangegangenen Abschnitt (Kap. 2.4.1.2) beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt, bei dem Membranströme durch auftretende Spannungsabfälle zwischen Pipetten- und Badelektrode gemessen werden. Zu Beginn einer Messung, noch bevor die Pipette die Zelle berührt, fließt ein Strom zwischen den beiden Elektroden, obwohl  $V_{cmd} = 0$  mV beträgt. Die Triebkräfte dieses Stromes (*Offset*) sind gemäß Gleichung G2.1 die Elektrodenpotentiale der  $Ag^+/AgCl$ - Elektroden ( $V_{PE}$ ,  $V_{RE}$ ) und das Kontaktpotential zwischen den beiden Elektrolytlösungen ( $V_{LJ}$ ). Der Strom, der

$$V = V_{cmd} + V_{PE} + V_{RE} + V_{LJ} \quad \text{G2.1}$$

**Gleichung G2.1:**  $V$ : Potential zwischen Pipetten- und Referenzelektrode.  $V_{cmd}$ : Sollspannung.  $V_{PE}$ ,  $V_{RE}$ : Elektrodenpotential der Pipetten- (PE) bzw. der Referenzelektrode (RE).  $V_{LJ}$ : Liquid Junction Potential.

aufgrund dieser Offset-Potentiale zwischen den beiden Elektroden fließt, wird zu Beginn jeder Messung auf 0 pA geklemmt, ein Referenzwert, auf den sich alle Ströme während des Experiments beziehen. Dieser Abgleich bedeutet aber auch, dass die Sollspannung ( $V_{cmd}$ ) mit der tatsächlichen Spannung zwischen den beiden Elektroden ( $V$ ) gleichgesetzt wird und somit  $V_{PE}$ ,  $V_{RE}$  und  $V_{LJ}$  einen Wert von 0 mV

erhalten. Bei  $V_{PE}$  und  $V_{RE}$  ist dies legitim, da sich die Elektrodenpotentiale während eines Experiments nur dann ändern, wenn sich in der Pipetten- und/oder der Badlösung die Konzentrationen von  $Ag^+$  bzw.  $Cl^-$  ändert, ein Szenario, das durch gute Planung der entsprechenden Lösungen verhindert werden kann. Das Liquid Junction Potential ( $V_{LJ}$ ) hingegen kommt durch die unterschiedlichen Mobilitäten der Ionen an der Kontaktfläche zwischen Pipetten- und Badlösung zustande und hat bei unterschiedlichen Pipetten- und Badlösungen meist einen von 0 mV abweichenden Wert. Bei Erreichen des Gigaohm-Seals (siehe Kap.2.4.1.1) sind die beiden Lösungen jedoch durch einen hohen Widerstand voneinander getrennt und stehen nicht mehr miteinander in Kontakt, was zum Verschwinden dieses Potentials führt. Aus diesem Grund ist die tatsächliche Spannung zwischen den beiden Elektroden (V) nach Erreichen des *Cell-Attached*-Modus eigentlich nicht gleich der Sollspannung ( $V_{cmd}$ ), sondern muss um den Wert des  $V_{LJ}$  korrigiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Korrektur nur bei einigen Versuchsanordnungen vorgenommen und ist gesondert in Kapitel 2.4.4 erwähnt.

#### 2.4.1.3.2. Der Zugangswiderstand

Den Ganzzellmodus in Patch-Clamp-Messungen erreicht man durch die Applikation eines starken Unterdrucks auf die Patch-Pipette während der *Cell-Attached*-Konfiguration. Dadurch wird der *Patch* zerstört und man bekommt mit der Pipettenelektrode einen direkten elektrischen Zugriff auf das Cytosol. Jedoch besteht zwischen der Elektrode und dem Zellinneren ein Widerstand (Zugangs- oder Serienwiderstand  $R_s$ , Abb. 2.3), der hauptsächlich durch die Größe der Öffnung der Mikropipette, und auch durch Membranfragmente und anderes Zellmaterial, welches sich in der Nähe der Pipettenmündung befindet, determiniert wird. Kleine Werte von  $R_s$  verbessern den elektrischen Zugriff auf das Zellinnere und minimieren so Fehler, die beim Klemmen des Membranpotentials entstehen. Diese Fehler werden insbesondere bei großen Membranströmen manifest, also dann, wenn große Ströme über die Pipettenelektrode injiziert werden müssen, um das Membranpotential zu klemmen (Abb. 2.3). Um Fehler durch den Serienwiderstand zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit während der meisten Messungen die Serienwiderstandskompensation des Verstärkers aktiviert (siehe Kap. 2.4.3). Da das Rückkopplungssystem bei hohen Kompensationswerten oft zu schwingen beginnt, was zu undefinierten Spannungen und zur Beschädigung der Zelle führte, wurden standardmäßig nur 50% des Fehlers korrigiert, was jedoch trotzdem die Spannungsfehler auf weniger als 5 mV reduzierte.

#### 2.4.1.3.3. Spannungs- und Stromkonventionen

Durch den Abgleich der *Offset*-Potentiale (siehe Kap. 2.4.1.3.1) wird die Spannung zwischen Referenz- und Pipettenelektrode auf den Referenzwert 0 mV gesetzt.



Dies bedeutet, dass bei Messungen im Ganzzellmodus und im *Outside-Out*-Modus positive Spannungen eine positive Ladung des Zellinneren gegenüber dem Bad ausdrücken, und umgekehrt bei negativen Spannungen das Zellinnere gegenüber dem Bad negativ geladen ist. Kationen, die die Membran von innen nach außen überqueren, erzeugen somit positive Ströme (Auswärtsströme) und Kationen, die die Membran von außen nach innen überqueren, negative Ströme (Einwärtsströme).

## 2.4.2. Ionenkanäle: Theoretische Grundlagen

### 2.4.2.1. Permeation von Ionen durch Kanäle

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die den passiven Transport von Ionen durch eine intramolekulare Pore über die Zellmembran ermöglichen. Die Triebkraft dieses Transports wird dabei durch das Membranpotential sowie das Konzentrationsgefälle der Ionen zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Lösung determiniert. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (G2.2) kann das Konzentrationsgefälle eines Ions als elektrisches Potential ( $E_{\text{ion}}$ ) ausgedrückt werden:

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Ion}]_o}{[\text{Ion}]_i} \quad \text{G2.2}$$

**Gleichung G2.2:** Nernst-Gleichung.  $E_{\text{ion}}$ : Nernst-Potential des Ions.  $R$ ,  $T$ ,  $z$  und  $F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur, Valenz des permeierenden Ions und Faraday-Konstante.  $[\text{Ion}]_i$  und  $[\text{Ion}]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration des permeierenden Ions.

Wenn das Membranpotential kleiner als  $E_{\text{ion}}$  ist, dann ist der Nettostrom eines Kations in die Zelle gerichtet (Einwärtsstrom) und umgekehrt. Um die Ionenpermeation durch einen Kanal zu beschreiben, reicht jedoch die Nernst-Gleichung allein oftmals nicht aus. Einerseits enthalten die Lösungen auf beiden Seiten der Membran nicht nur eine Ionenspezies, sondern stellen ein Gemisch aus verschiedenen Ionen dar. Andererseits leiten die meisten Kanäle mehrere Ionenspezies und sind für unterschiedliche Ionen aufgrund der Beschaffenheit ihrer Pore unterschiedlich gut permeabel. Diese Bedingungen sind in der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK) fassbar, welche den Parameter der Permeabilität ( $P$ ) einführt, um die unterschiedlich gute Permeation von verschiedenen Ionenspezies durch Kanäle mathematisch auszudrücken:

$$V_{\text{rev}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum P_X [X^+]_o}{\sum P_X [X^+]_i} \quad \text{G2.3}$$

**Gleichung G2.3:** Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für monovalente Kationen.  $V_{\text{rev}}$ : Umkehrpotential.  $R$ ,  $T$ ,  $z$  und  $F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur, Valenz des Ions  $X^+$  ( $=1$ ) und Faraday-Konstante.  $P_X$ : Permeabilität des Kanals für das Ion  $X^+$ .  $[X^+]_i$  und  $[X^+]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von  $X^+$ .

Gleichung G2.3 kann für die Ionenpermeation monovalenter Kationen ( $X^+$ ) durch kationenselektive Kanäle angewendet werden. Um auch die Permeation divalenter Kationen zu berücksichtigen, bedarf es der Einführung eines Hilfsparameters ( $P'$ ), da sich hier die Valenz  $z$  im ersten Term auf der rechten Seite (von G2.3) von 1 unterscheidet und nicht ohne Weiteres aus dem logarithmischen Term auszuklammern ist (Lewis, 1979). Nach GHK gilt das Unabhängigkeitsprinzip, welches besagt, dass der Gesamtstrom durch einen Kanal gleich der Summe der Partialströme ist, da sich die einzelnen Ionen bei der Permeation nicht gegenseitig beeinflussen:

$$I_{\text{total}} = \sum I_X + \sum I_Y \quad \text{G2.4a}$$

Partialströme sind (theoretische) Teilströme, die nur durch eine bestimmte Ionenspezies ( $X^+$  oder  $Y^{2+}$ ) hervorgerufen werden und sind nach GHK definiert durch G2.4b und G2.4c:

$$I_X = \frac{F^2 P_X V}{RT} \frac{[X^+]_o - [X^+]_i \exp \frac{FV}{RT}}{1 - \exp \frac{FV}{RT}} \quad \text{G2.4b}$$

$$I_Y = \frac{4F^2 P_Y V}{RT} \frac{[Y^{2+}]_o - [Y^{2+}]_i \exp (2 \frac{FV}{RT})}{1 - \exp (2 \frac{FV}{RT})} \quad \text{G2.4c}$$

Mit

$$P'_Y = \frac{P_Y}{1 + \exp \frac{FV}{RT}} \quad \text{G2.4d}$$

erhält G2.4c den gleichen Nenner wie G2.4b:

$$I_Y = \frac{4F^2 P'_Y V}{RT} \frac{[Y^{2+}]_o - [Y^{2+}]_i \exp (2 \frac{FV}{RT})}{1 - \exp \frac{FV}{RT}} \quad \text{G2.4e}$$

**Gleichungen G2.4a bis e:** Partial- und Totalströme von mono- und divalenten Kationen nach Goldman-Hodgkin-Katz (GHK).  $I_{\text{total}}$ : Gesamtstrom durch einen Ionenkanal.  $I_X$  und  $I_Y$ : durch mono- ( $X^+$ ) und divalente ( $Y^{2+}$ ) Kationen hervorgerufene Partialströme durch den Kanal.  $V$ : Membranpotential.  $R$ ,  $T$  und  $F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $P_X$  und  $P_Y$ : Permeabilität des Kanals für das Ion  $X^+$  bzw.  $Y^{2+}$ .  $[X^+]_i$  und  $[X^+]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von  $X^+$ .  $[Y^+]_i$  und  $[Y^+]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von  $Y^{2+}$ .

Um das Umkehrpotential zu berechnen, muss nun G2.4a null gesetzt und G2.4b und G2.4e für die Partialströme mono- und divalenter Kationen verwendet werden. Man erhält nach Vereinfachen und Umstellen:

$$V_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_X [X^+]_o + 4 \sum P'_Y [Y^{2+}]_o}{\sum P_X [X^+]_i + 4 \exp \frac{FV_{\text{rev}}}{RT} \sum P'_Y [Y^{2+}]_i} \quad \text{G2.5}$$

**Gleichung G2.5:** Theoretisches Umkehrpotential in Abhängigkeit von mono- und divalenten Kationen auf der intra- und extrazellulären Seite der Membran nach GHK.  $V_{\text{rev}}$ : Umkehrpotential.  $R$ ,  $T$  und  $F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $P_X$  und  $P'_Y$ : Permeabilität des Kanals für das Ion  $X^+$  bzw.  $Y^{2+}$  (siehe G2.4d).  $[X^+]_i$  und  $[X^+]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von  $X^+$ .  $[Y^+]_i$  und  $[Y^+]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von  $Y^{2+}$ .

Für die Berechnung der Permeabilität eines mono- oder divalenten Kations wird G2.5 nach  $P_Z$  bzw.  $P'_Z$  umgestellt:

$$P_Z = \frac{\exp \frac{FV_{\text{rev}}}{RT} \sum_{X \neq Z} P_X [X^+]_i - \sum_{X \neq Z} P_X [X^+]_o + 4 \exp \frac{2FV_{\text{rev}}}{RT} \sum P'_Y [Y^{2+}]_i - 4 \sum P'_Y [Y^{2+}]_o}{[Z^+]_o - \exp \left( \frac{FV_{\text{rev}}}{RT} \right) [Z^+]_i} \quad \text{G2.6a}$$

$$P'_Z = \frac{\exp \frac{FV_{\text{rev}}}{RT} \sum P_X [X^+]_i - \sum P_X [X^+]_o + 4 \exp \frac{2FV_{\text{rev}}}{RT} \sum_{Y \neq Z} P'_Y [Y^{2+}]_i - 4 \sum_{Y \neq Z} P'_Y [Y^{2+}]_o}{[Z^{2+}]_o - \exp \left( \frac{2FV_{\text{rev}}}{RT} \right) [Z^{2+}]_i} \quad \text{G2.6b}$$

**Gleichungen G2.6a und b:** Permeabilität des mono- (G2.6a) bzw. divalenten (G2.6b) Kations  $Z$  unter Berücksichtigung aller mono- und divalenten Kationen auf der intra- und extrazellulären Seite der Membran nach GHK.  $P_Z$ : Permeabilität des Ions  $Z$ .  $V_{\text{rev}}$ : Umkehrpotential.  $R$ ,  $T$  und  $F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $P_X$  und  $P'_Y$ : Permeabilität des Kanals für mono- ( $X^+$ ) bzw. divalente ( $Y^{2+}$ , siehe G2.4d) Kationen.  $[X^+]_i / [X^+]_o$ ,  $[Y^+]_i / [Y^+]_o$  und  $[Z]_i / [Z]_o$ : intra- bzw. extrazelluläre Konzentration der Kationen  $X^+$ ,  $Y^{2+}$  bzw.  $Z^+$  oder  $Z^{2+}$ . Durch Einsetzen der entsprechenden Konzentrationen ergibt sich aus Gleichung G2.6a die Gleichung G3.1 und aus Gleichung G2.6b die Gleichung G3.2b.

Die Gleichungen G2.6a und G2.6b vereinfachen sich signifikant, wenn entweder die extrazelluläre, die intrazelluläre oder beide Lösungen lediglich ein permeierendes Kation enthalten. Da nach GHK das Unabhängigkeitsprinzip gilt, können auch relative Permeabilitäten ermittelt werden, ohne die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung zu berücksichtigen, weil gilt:

$$\frac{P_A}{P_B} = \frac{P_A}{P_C} \frac{P_C}{P_B}$$

G2.7

**Gleichung G2.7:**  $P_A$ ,  $P_B$  und  $P_C$ : Permeabilität des Kanals für die Kationen A, B und C.

und die intrazelluläre Lösung über die Dauer der Messung konstant bleibt. Unter Anwendung von G2.7 kann die relative Permeabilität von Ion A gegenüber B (A und B jeweils von der extrazellulären Seite der Membran appliziert) ermittelt werden, und alle Terme, welche die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (C) ausdrücken, kürzen sich heraus (siehe G3.3 und G3.4).

### 2.4.2.2. Die Eisenman-Theorie

Elementare Kationen besitzen in wässrigen Lösungen eine Hydrathülle. Diese ist umso größer, je größer die Elektronegativität des Elements ist. Eisenman (1962) konnte zeigen, dass Kationen in Abhängigkeit der Stärke eines externen elektrischen Felds ihre Hydrathülle abstreifen. Der effektive Ionenradius (Ion plus Hydrathülle) ist somit abhängig vom angelegten elektrischen Feld. Ordnet man die Alkalimetall-Ionen ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) gemäß ihres effektiven Ionenradius, dann sind, abhängig von der Stärke des elektrischen Felds lediglich elf verschiedene Sequenzen möglich (Abb. 2.4).

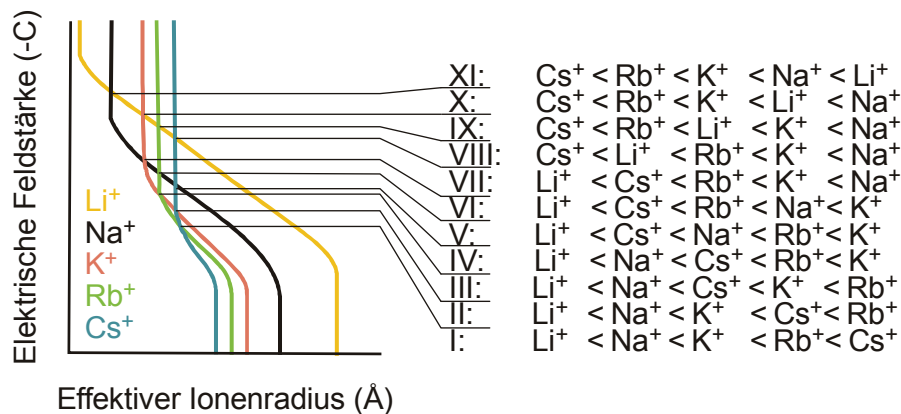


Abb. 2.4: Zusammenhang zwischen Feldstärke und effektivem Ionenradius.

Bei der Permeation durch Kanäle werden Ionen am Selektivitätsfilter dehydratisiert. Selektivitätsfilter besitzen ein elektrisches Feld, das aufgrund des molekularen Aufbaus (Aminosäuren) des Kanals zustande kommt. Dieses ist etwa stärker, wenn viele geladene Aminosäuren am Aufbau des Filters beteiligt sind. Gemäß des elektrischen Felds am Selektivitätsfilter werden die permeierenden Kationen dann dehydratisiert und permeieren umso besser, je kleiner der effektive Ionenradius ist. Dadurch geben die relativen Permeabilitäten für Kationen indirekt Hinweise auf die elektrostatischen Eigenschaften des Selektivitätsfilters.

### 2.4.2.3. Die Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen

Ein wichtiges Charakteristikum von Ionenkanälen ist die Offenwahrscheinlichkeit, welche die Zeit, in der ein Kanal offen ist, in Relation zur Gesamtzeit ausdrückt (Gleichung G2.8 und Abb. 2.5). Die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals ist umso größer, je größer die Anzahl der einzelnen Öffnungsereignisse (meist ausgedrückt als Frequenz) ist und je länger ein Kanal während solch einem Ereignis geöffnet bleibt (Offenzeit).  $P_o$  kann bei vielen Kanälen durch chemische Stimuli (Liganden) modifiziert werden. Bei spannungsabhängigen Kanälen hingegen ist die Offenwahrscheinlichkeit eine Funktion des Membranpotentials ( $P_o(V)$ ), d.h., dass ein entsprechender Kanal bei aktivierenden Spannungen eine höhere Offenwahrscheinlichkeit hat als bei deaktivierenden Spannungen.

$$P_o = \frac{t_o}{t_o + t_g} \quad \text{G2.8}$$

**Gleichung G2.8:**  $P_o$ : Offenwahrscheinlichkeit des Kanals.  $t_o$  und  $t_g$ : Zeit, in der der Kanal während einer Einzelkanalspur offen bzw. geschlossen ist.

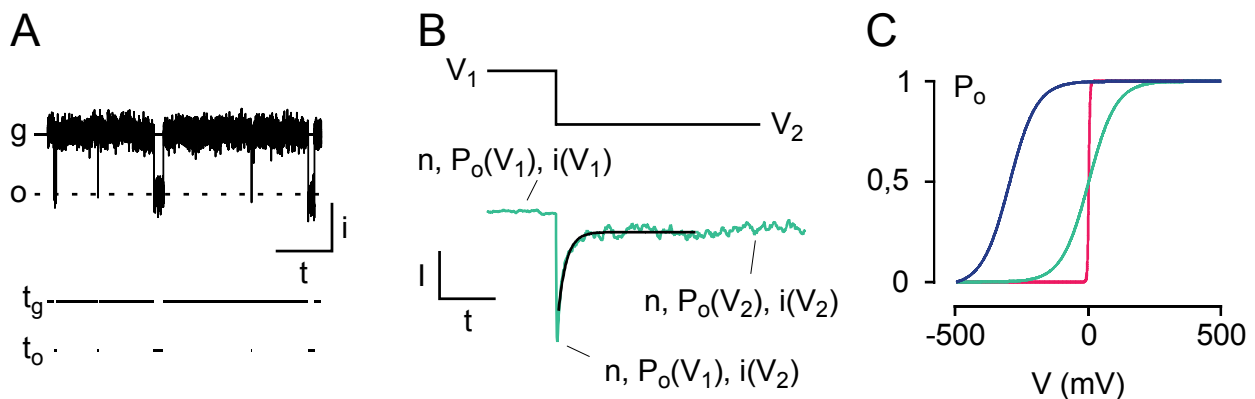


Abb. 2.5: **Determination der Offenwahrscheinlichkeit.** A: Ausschnitt aus einer Einzelkanalmessung im Outside-Out-Modus. Die Offenwahrscheinlichkeit berechnet sich nach Gleichung G2.8. o und g: offener bzw. geschlossener Zustand des Kanals. B: Bei spannungsabhängigen Kanälen sind nach Spannungssprüngen zu deaktivierenden Potentialen Tailströme zu beobachten. Da sich die  $P_o(V_2)$  langsamer einstellt als  $i(V_2)$ , ist die instantane Stromamplitude proportional zu  $P_o(V_1)$ . C: Hypothetische  $P_o$ - $V$ -Beziehungen eines spannungsabhängigen Kanals nach dem *Two-State-Model*. Die rote Kurve wurde mit einer Gating Charge von  $z = 11e$  berechnet, die blauen mit  $z = 0,5e$ . Bei der dunkelblauen Kurve ist  $V_{1/2} = -300$  mV, im Gegensatz zu den anderen beiden, wo  $V_{1/2} = 0$  mV ist.

Das einfachste Modell zur Beschreibung einer Spannungsabhängigkeit ist das *Two-State-Model*, das jeweils nur einen geschlossenen und einen offenen Zustand des untersuchten Kanals vorsieht (Abb. 2.5). Bei diesem Modell ist die  $P_o$ - $V$ -Beziehung eines Kanals sigmoidal und gibt wesentliche Eigenschaften seiner Spannungsabhängigkeit wieder (G2.9). Als *Gating Charge* ( $z$ ) wird die Ladung bezeichnet, die beim spannungsabhängigen Öffnen bzw. Schließen durch das elektrische Feld der Membran bewegt wird. Je größer diese ist, desto ausgeprägter

ist die Spannungsabhängigkeit des Kanals.  $V_{1/2}$  kennzeichnet das Potential, bei dem die in Gleichung G2.8 verwendeten Variablen  $t_o$  und  $t_g$  gleich groß sind. Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit eines Ionenkanals wird die Offenwahrscheinlichkeit jedoch für gewöhnlich nicht im Einzelkanalmodus bestimmt, sondern aus den Strömen im Ganzzellmodus abgeleitet. Diese hängen mit den Einzelkanalströmen gemäß Gleichung G2.10 zusammen. Ändert man das Membranpotential

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{zF}{RT}(V_{1/2} - V)\right)} \quad \text{G2.9}$$

**Gleichung G2.9:** Offenwahrscheinlichkeitsfunktion nach dem Two-State-Model.  $P_o$ : Offenwahrscheinlichkeit des Kanals.  $V$  und  $V_{1/2}$ : Potential ( $V$ ) und Potential, bei dem die Hälfte der Kanäle offen sind.  $R$ ,  $T$  und  $F$ : Universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $z$ : *Gating Charge* (als Vielfaches der Elementarladung).

im Voltage-Clamp-Modus von  $V_1$  nach  $V_2$  (Spannungssprung), so ändern sich die Werte von  $P_o$  und  $i$  gemäß  $V_2$ , während  $n$  konstant bleibt. Da der Wechsel von  $i(V_1)$  nach  $i(V_2)$  fast instantan vollzogen ist, die Anpassung von  $P_o$  an  $V_2$  (meist) jedoch deutlich langsamer vonstatten geht, geben die Ganzzellströme kurz nach einem Spannungssprung (Tailströme) im Wesentlichen die Offenwahrscheinlichkeit wieder. Gemäß eines *Two-State-Models* haben Tailströme einen monoexponentiellen Zeitverlauf, und damit genau eine Zeitkonstante ( $\tau$ ).

$$I = n P_o i = n P_o \gamma (V - V_{rev}) \quad \text{G2.10}$$

**Gleichung G2.10:**  $I$ : Amplitude des Ganzzellstroms.  $i$ : Einzelkanalamplitude, beide bei ein und demselben Membranpotential  $V$ .  $P_o$ : Offenwahrscheinlichkeit.  $n$ : Anzahl der Kanäle in der Zellmembran. Die Einzelkanalamplitude  $i$  kann auch als Produkt aus der Einzelkanalleitfähigkeit ( $\gamma$ ) und der Triebkraft des Stroms ( $V - V_{rev}$ ) ausgedrückt werden.

### 2.4.3. Aufnahmebedingungen der Patch-Clamp-Experimente

Für Patch-Clamp-Experimente wurden die HEK293-Zellen entweder in 35 mm-Nunc-Schalen oder auf Glasplättchen gemessen. Die Messkammern sorgten jeweils für ein kleines Flüssigkeitsvolumen und ermöglichten einen kontinuierlichen Durchfluss der Badlösung. Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur statt (20°C - 25°C). Es wurden ausschließlich einzelne Zellen gemessen, die nicht mit Nachbarzellen verbunden waren. Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX 70, Hamburg, Deutschland) bei einer Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 488 nm identifiziert. Die Pipetten wurden mit Hilfe eines Pullers (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) aus Borosilicat-Glasröhrchen (Science Products, Hofheim, Deutschland) gezogen und hatten Widerstände von 3 bis 6 M $\Omega$  für Ganzzellmessungen und von

5 bis 8 M $\Omega$  für Einzelkanalmessungen. Um die Pipettenkapazität bzw. das Hintergrundrauschen zu verringern, wurden bei Experimenten zur Spannungsabhängigkeit und bei Messungen im *Outside-Out*-Modus die Pipettenspitzen mit dem Polymer R-6101 (Dow Chemicals, La Jolla, USA) beschichtet. Patch-Clamp-Messungen wurden entweder mit einem EPC-7-, EPC-9- oder EPC10-Verstärker und der Pulse-Software (HEKA, Lamprecht, Deutschland) durchgeführt.

In den meisten *Whole-Cell*-Messungen wurden die Zellen bei einem Haltepotential von -60 mV geklemmt, und Strom-Spannungs (I-V)-Beziehungen wurden alle 4 s durch die Applikation von Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV mit einer Dauer von 400 ms gewonnen. Auch andere Spannungsprotokolle (Pulse), die jeweils im Ergebnisteil bei den entsprechenden Experimenten abgebildet sind, wurden im Abstand von 3 bis 5 s appliziert. Ströme während der Spannungsprotokolle wurden mit 4 kHz gefiltert (4-pole Bessel) und mit 20 kHz digitalisiert. Der Strom beim Haltepotential wurde zwischen den Spannungsprotokollen diskontinuierlich mit 30 Hz aufgezeichnet. Ganzzellmessungen mit einem zu hohen Serienwiderstand wurden verworfen. Die Serienwiderstandskompensation ( $R_s$ -Kompensation) wurde bei allen Messungen aktiviert (50%), in Messungen zur Spannungsabhängigkeit wurde ein größerer Kompensationsfaktor (70%) gewählt. Ausnahme waren die Messungen mit einem EPC-7-Verstärker, bei dem das Rückkopplungssystem oft zu schwingen begann; hier wurde keine  $R_s$ -Kompensation verwendet. Dies betraf die im Ergebnisteil vorgestellten Daten zu den Abbildungen 3.3 (C+D), 3.7 und 3.10. Das *Liquid Junction Potential* wurde nicht online (also während der Messung) korrigiert. Die nachträgliche Korrektur ist in Kapitel 2.4.4.2 gesondert beschrieben.

Bei Einzelkanalmessungen im *Outside-Out*-Modus betrug das Haltepotential, sofern nicht anders angegeben, -60 mV. Die einzelnen Spuren waren jeweils 30 s bis 2 min lang und wurden nach Filtern (4 kHz, 4-pole Bessel) mit einer Frequenz von 20 kHz aufgezeichnet.

#### 2.4.4. Lösungen

Sofern nicht gesondert erwähnt, wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Taufkirchen, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Für alle Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Optipure Analytical-Anlage (MembraPur GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet. Die Osmolaritäten aller Lösungen wurden mithilfe eines Dampfdruckpunkt-Osmometers (Vapro 5520, Wescor Inc.) getestet und lagen zwischen 290 und 310 mosm/l. Zum Justieren des pH-Werts wurde ein InoLab<sup>®</sup> pH 720 - pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland) verwendet.

### 2.4.4.1. Standard-Extrazellulärlösung und Standard-Intrazellulärlösung

Die Standard-Extrazellulärlösung enthielt 140 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CsCl sowie 10 mM Glucose und 10 mM HEPES (pH 7,4 mit NaOH). Die Standard-Pipettenlösung bestand aus 110 mM Cs-Methansulfonat, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,62 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, and 30 mM HEPES (pH 7.2 mit CsOH), wobei eine Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> von 100 nM errechnet wurde (MaxChelator, C. Patton, Stanford, USA). Das *Liquid Junction Potential* zwischen Standard-Badlösung und Standard-Pipettenlösung wurde mit Patcher's Power Tools (F. Würriehausen, Göttingen, Deutschland) und IGOR 6.03 (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) berechnet und betrug +8,5 mV.

Um G-Proteine zu aktivieren, enthielt die Pipettenlösung in einigen Experimenten 30 µM Aluminium-Fluorid (AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>) oder 5 mM Li<sub>4</sub>-GTPγS. Für Experimente mit AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> wurden 1 µl NaF (0,5 M) mit 0,5 µl AlCl<sub>3</sub> (3 mM) gemischt und in 50 µl der Pipettenlösung aufgenommen. Li<sub>4</sub>-GTPγS wurde als Pulver bestellt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), mit ddH<sub>2</sub>O in 500 mM-Stocks á 0,4 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für Experimente mit diesem Aktivator wurde jeweils ein Aliquot mit 40 µl Pipettenlösung verdünnt. Das *Liquid Junction Potential* zwischen der Standard-Pipettenlösung mit Li<sub>4</sub>-GTPγS und der Standard-Badlösung betrug +8,60 mV und wich somit nur marginal von dem Wert in Abwesenheit von Li<sub>4</sub>-GTPγS ab. Da Li<sup>+</sup> an Nucleosidtriphosphate mit deutlich höherer Affinität als Cs<sup>+</sup> bindet (Smith & Martell, 1975), führte die Addition von Li<sub>4</sub>-GTPγS lediglich zu geringen Veränderungen der Ionenaktivitäten (< 5 mM), die bei den Permeabilitätsberechnungen nicht berücksichtigt wurden.

### 2.4.4.2. Weitere Lösungen

Die Experimente zur Spannungsabhängigkeit von TRPC5 fanden ausschließlich in Standard-Lösungen (siehe Kap. 2.4.4.1) statt. Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Ströme durch TRPC5 wurden die Lösungen abweichend von der Standard-Extrazellulärlösung (HEPES) mit den in Tabelle 2.4

Tabelle 2.4: **Verwendete Puffersysteme in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten.**

pH-Bereich	Puffer
8,0 bis 7,0	10 mM HEPES
6,8 bis 5,5	10 mM MES
4,2	30 mM Citrat

zusammengefassten Verbindungen gepuffert. Die Konzentrationen der anderen Ionen richteten sich nach der Standard-Badlösung. In Citrat-gepufferten Lösungen mussten 4,4 mM CaCl<sub>2</sub> und 1,9 mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt werden, um dieselben freien Konzentrationen (Ca<sup>2+</sup>:

2 mM, Mg<sup>2+</sup>: 1 mM) wie in der Standard-Badlösung zu erhalten. Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Ionenpermeation durch TRPC5 wurden Badlösungen hergestellt, die nominell nur eine elementare Kationenspezies enthielten (entweder 150 mM Na<sup>+</sup> bzw. Cs<sup>+</sup> oder 100 mM Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup>). Die Na<sup>+</sup>-



und Cs<sup>+</sup>-basierten Lösungen enthielten 140 mM NaCl (oder CsCl), 10 mM NaOH (oder CsOH), 10 mM HEPES und 10 mM Glucose, der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt. Die Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-basierten Lösungen enthielten 90 mM CaCl<sub>2</sub> (oder MgCl<sub>2</sub>), 10 mM Ca(OH)<sub>2</sub> (oder Mg(OH)<sub>2</sub>, jeweils 10 ml/l aus einem 1M-Stock), 10 mM HEPES und 10 mM Glucose (pH 7,4 mit HCl). Zusätzlich zu diesen Lösungen wurde eine N-Methyl-D-Glucamin (NMDG<sup>+</sup>)-basierte Lösung hergestellt, die 150 mM NMDGCl, 10 mM HEPES und 10 mM Glucose enthielt (pH 7,4 mit HCl). Lösungen mit weniger als 150 mM eines monovalenten (Na<sup>+</sup> oder Cs<sup>+</sup>) oder weniger als 100 mM eines divalenten Kations (Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup>) wurden durch Mischen der Na<sup>+</sup>-, Cs<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>- mit der NMDG-basierten Lösung hergestellt (Tab. 2.5). Im Falle der Na<sup>+</sup>- und Cs<sup>+</sup>-basierten Lösungen veränderte sich dadurch nur die Konzentration der monovalenten Kationen. Bei den Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-basierten Lösungen kam es jedoch dadurch zusätzlich zu Veränderungen in der Cl<sup>-</sup>-Konzentration, was Auswirkungen auf das Elektrodenpotential der Badelektrode beim Lösungswechsel hatte. Die Differenz des Elektrodenpotentials in den einzelnen (divalenten) Lösungen zu dem in der Standard-Extrazellürlösung wurde mit JPCalc ( P.H. Barry, New South Wales, Australien) berechnet und bei der Datenanalyse zusammen mit dem *Liquid Junction Potential* korrigiert.

**Tabelle 2.5: Herstellung und Eigenschaften von Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an divalenten Kationen Y<sup>2+</sup>.** *Links:* Endkonzentration an divalenten Kationen ([Y<sup>2+</sup>]), mit G2.11 berechnete Aktivitätskoeffizienten für Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> sowie NMDG<sup>+</sup> (f<sub>Ca</sub>, f<sub>Mg</sub> und f<sub>NMDG</sub>). *Mitte,* Mischverhältnis der Ca<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>- basierten Lösung (Y<sup>2+</sup>-Lsg.) mit der NMDG<sup>+</sup>-basierten Lösung (NMDG<sup>+</sup>-Lsg. Zusammensetzungen siehe Text). *Rechts:* Endkonzentration an Cl<sup>-</sup> in den Lösungen ([Cl<sup>-</sup>]<sub>o</sub>), *liquid junction*-Potentiale (V<sub>LJ</sub>) und Änderung des Potentials an der Badelektrode (V<sub>EI</sub>) infolge der Änderung von [Cl<sup>-</sup>]<sub>o</sub>.

[Y <sup>2+</sup> ] (mM)	f <sub>Ca</sub>	f <sub>Mg</sub>	f <sub>NMDG</sub>	Y <sup>2+</sup> - Lsg. (ml)	NMDG <sup>+</sup> - Lsg. (ml)	[Cl <sup>-</sup> ] <sub>o</sub> (mM)	V <sub>LJ</sub> (mV)	V <sub>EI</sub> (mV)
0	-	-	0,749	0	50	150	8,5	0
5	0,352	0,402	0,746	2,5	47,5	152,5	8,5	0,4
10	0,347	0,398	0,743	5	45	155	8,5	0,9
20	0,339	0,391	0,737	10	40	160	8,5	1,7
50	0,317	0,372	0,721	25	25	175	8,5	4
100	0,291	0,349	-	50	0	200	8,5	7,4

Für die Bestimmung der Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Permeabilitäten von TRPC5 und der Mutanten wurde einerseits die oben beschriebene Na<sup>+</sup>-basierte Lösung (150 mM) verwendet, und andererseits wurden Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-basierte Lösungen hergestellt, die dieselbe Cl<sup>-</sup>-Konzentration wie die Na<sup>+</sup>-Lösung hatten. Somit blieb hier das Elektrodenpotential an der Badelektrode beim Lösungswechsel konstant und

musste nicht korrigiert werden. Die Lösungen enthielten jeweils 30 mM CaCl<sub>2</sub> (oder MgCl<sub>2</sub>), 90 mM NMDGCl, 10 mM HEPES und 10 mM Glucose (pH 7,4 mit HCl). In Elektrolytlösungen kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den gelösten Ionen, was dazu führt, dass der Stoffmengenanteil an frei verfügbaren Teilchen geringer ist als deren Konzentration. Um dies zu berücksichtigen, wurden die Konzentrationen bei den Experimenten zum Umkehrpotential (Kap. 3.4.1) und bei den Experimenten zur Bestimmung der P<sub>30Y</sub>/P<sub>150Na</sub> von TRPC5-WT (und Mutanten, Kap. 3.4.3) mit Aktivitätskoeffizienten korrigiert. Diese wurden, der Bates-Guggenheim-Konvention folgend, mithilfe von Gleichung G2.11 berechnet. Obwohl die Ionenstärke in allen verwendeten Lösungen deutlich größer als 0,1 mM war, erschien diese Prozedur vorteilhafter als die Verwendung von experimentell bestimmten Aktivitätskoeffizienten. Grund dafür ist die Tatsache, dass bei der Berechnung gemäß G2.11 alle übrigen in der Lösung verwendeten Ionen mit berücksichtigt werden. Die Bates-Guggenheim-Konvention wurde auch in der Literatur bereits zur Berechnung von Einzelionen-Aktivitätskoeffizienten für elektro-

$$\log(\gamma_X) = \frac{-0,509 z_X \sqrt{0,5 \sum_i z_i^2 c_i}}{1 + 3,29 a_X \sqrt{0,5 \sum_i z_i^2 c_i}} \quad (\text{G2.11})$$

**Gleichung G2.11:** Berechnung des Aktivitätskoeffizienten  $\gamma$  vom Ion X.  $z_X$  und  $z_i$ : Valenz von Ion X und aller enthaltenden Ionen,  $c_i$ : Konzentration aller enthaltenden Ionen,  $a_X$ : hydratisierter Ionenradius von Ion X. Formel übernommen von Brian M. Tissue (Blacksburg, Virginia)

physiologische Lösungen verwendet (z.B. Wollmuth & Sakmann, 1998). Die hydratisierten Ionenradii wurden aus Kielland (1937) übernommen, für NMDG<sup>+</sup> der Wert von 4,5 Å aus Eickhorst *et al.* (2002). Die verwendeten Koeffizienten für unterschiedliche Konzentrationen an Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> und NMDG<sup>+</sup> können aus Tabelle 2.5 entnommen werden. Zusätzlich wurde für Lösungen mit 30 mM Ca<sup>2+</sup> ein Aktivitätskoeffizient von 0,339 und für 30 mM Mg<sup>2+</sup> von 0,391 berechnet. Die Konzentration von Na<sup>+</sup> wurde in allen extrazellulären Lösungen mit  $\gamma=0,740$  korrigiert, die von Cs<sup>+</sup> mit 0,709, und die von NMDG<sup>+</sup> in den Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration an monovalenten Kationen mit 0,749.

Die Lösungen zur Bestimmung der Permeabilitäten von TRPC5 für monovalente Kationen orientierten sich an der Standard-Badlösung. Es wurden alle Alkalimetall-Kationen (X<sup>+</sup>) untersucht: Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> und Cs<sup>+</sup>. Die Lösungen enthielten jeweils 140 mM XCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES und 10 mM Glucose. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf pH 7,4 eingestellt, wobei die Menge an eingesetztem CsOH in den verschiedenen Lösungen von 4,4 mM bis 6,9 mM schwankte. Die Unterschiede in der Cs<sup>+</sup>-Endkonzentration wurden durch Zugabe von CsCl ausgeglichen, so dass die hier beschriebenen Lösungen alle 6,9 mM Cs<sup>+</sup> enthielten.

## 2.4.5. Datenanalyse und Statistik

Alle mit Pulse (HEKA, Lamprecht, Deutschland) aufgezeichneten Ströme wurden mit Hilfe von Patcher's Power Tools (F. Würriehausen, Göttingen, Deutschland) in IGOR 6.03 (Lake Oswego, USA) importiert und ausgewertet. Alle Werte sind jeweils angegeben als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of the Mean). Die Signifikanz zweier Datenreihen wurde mit dem *Student's t-test* in GraphPad (La Jolla, USA) getestet. Die Grenzwerte für eine Verwerfung der Nullhypothese entsprachen den üblichen Konventionen (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ ).

### 2.4.5.1. Auswertung von Ganzzellströmen

Aus den Strom-Zeit-Verläufen beim Haltepotential wurden sowohl die basalen Aktivitäten der untersuchten Kanäle (abgelesen kurz nach Erreichen des Ganzzellmodus) und die maximalen Ströme (Zeitpunkt je nach Qualität der G-Protein-Stimulation in der Zelle unterschiedlich) extrahiert. Die Stromdichten wurden durch Division der abgelesenen Ströme mit der Kapazität der Zelle, die mithilfe einer Abgleichsroutine des Pulse-Programms (HEKA, Lamprecht, Deutschland) während der Messung gewonnen wurde, berechnet. Um die Zu- oder Abnahme der Amplituden in den Strom-Zeitverläufen während der Applikation von Modulatoren zu quantifizieren, wurden vor und nach Gabe eines Modulators die Ströme interpoliert und die Ströme in Anwesenheit des Modulators auf die interpolierten Werte normiert. Diese Prozedur war notwendig, weil die G-Protein-aktivierten Ströme durch TRP-Kanäle mit der Zeit abnehmen. Die Konzentrations-Wirkungskurven für die Inhibition von TRPC5-E543Q und TRPC6 durch  $H^+$  (Abb. 3.14B, Abb. 3.20D, G2.12) wurden mit der Hill-Funktion gefittet.

$$y = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{x}\right)^n} \quad \text{G2.12}$$

**Gleichungen G2.12:** Hill-Funktion für inhibitorische Effekte. y: Amplitude. x: Konzentration.  $IC_{50}$ : Konzentration bei halbmaximaler Inhibition. n: Hill-Koeffizient.

Bei den Experimenten zur Spannungsabhängigkeit von TRPC-Kanälen wurden die Tailströme nach Spannungssprüngen von depolarisierenden zu hyperpolarisierenden Potentialen untersucht. Die Amplitude der instantanen Ströme wurde dabei jeweils 0,5 ms nach dem Spannungssprung abgelesen, um nicht vollständig abgegliche kapazitive Ströme von der Pipette und der Zellmembran, die trotz Kompensation auftreten können, zu umgehen. Für die in Abbildung 3.6 gezeigten Fits der Tailströme wurden die mono- bzw. doppelexponentiellen Funktionen von IGOR 6.03 (Lake Oswego, USA) verwendet. Die Bestimmung der Umkehrpotentiale erfolgte in 2 Schritten: Zunächst wurden alle durch Spannungsrampen gewonnenen I-V-Beziehungen einer Messung jeweils mit einer Polynomfunktion 9. Grades

gefittet, um rauschfreie I-V-Beziehungen zu erhalten, die die originalen Kurven sehr gut wiedergeben. Die Schnittpunkte der gefitteten I-V-Beziehungen mit der Spannungsachse wurden dann automatisch ausgelesen und als Umkehrpotentiale gegen die Zeit aufgetragen.

#### 2.4.5.2. Einzelkanalanalyse

Die Analyse der Einzelkanalspuren erfolgte mit Hilfe einiger selbst programmierter Routinen komplett in IGOR 6.03. Die Einzelkanalspuren wurden zunächst mithilfe von Patcher's Power Tools importiert und mit einem Gauss-Filter auf 1 kHz gefiltert, um die *signal-to-noise*-Ratio zu verbessern. Es folgte eine Baseline-Korrektur (geschlossener Zustand der Kanäle im Patch) durch Subtraktion einer durch Einführung von Knotenpunkten generierten Basislinie von der gefilterten Originalspur. Die Einzelkanalamplitude und die Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_o$ ) wurden anhand der All-Points-Histogramme der korrigierten Einzelkanalspuren ermittelt. Diese bestanden je nach Kanalaktivität im Patch aus zwei oder mehreren Gauss-Verteilungen (Abb. 2.6A), welche die verschiedenen Offenzustände der Kanäle sowie den geschlossenen Zustand repräsentieren. Die Einzelkanalamplitude wurde aus der Differenz der Mittelwerte der Gauss-Verteilungen des ersten offenen Zustands und des geschlossenen Zustands bestimmt. Für die Berechnung der  $nP_o$  wurde die Fläche unter der Gauss-Verteilung des geschlossenen Zustands in Relation zur Gesamtfläche unter dem Histogramm gesetzt (Gleichung G2.13).

$$nP_o = 1 - \frac{A_0}{A_{Ges}} \quad \text{G2.13}$$

**Gleichung G2.13:** Bestimmung der Werte für die Offenwahrscheinlichkeit aus dem All-Points-Histogramm.  $nP_o$ : Offenwahrscheinlichkeit aller Kanäle im Patch.  $A_0$ ,  $A_{Ges}$ : Fläche unter der Gauss-Verteilung des geschlossenen Zustands bzw. Gesamtfläche unter dem Histogramm.

Für die Bestimmung der Mittleren Offenzeiten und der Anzahl an Öffnungen pro Zeitintervall (Frequenz) wurden die Einzelkanalspuren mit einem Leveldetektor idealisiert. Dieser arbeitete unter Zuhilfenahme der ersten Ableitung der Ströme nach der Zeit, bei der ein Öffnungsereignis von zwei entgegengesetzten Peaks flankiert wird (Abb. 2.6B). Diese Peaks wurden nach manuellem Festlegen einer Erkennungsschwelle automatisch ausgelesen, und die Zeitpunkte der lokalen Maxima bzw. Minima den Öffnungen bzw. Schließungen von Kanälen zugeordnet. Die Maxima und Minima der ersten Ableitung fallen mit den Wendepunkten der Öffnung bzw. Schließung in der originalen Spur zusammen, was in etwa dem Zeitpunkt des halben Übergangs (halbe Amplitude) von einem Level zum anderen entspricht. Die oben beschriebene Idealisierungsprozedur stellte sich insgesamt als

wesentlich robuster heraus als die *Half Amplitude Threshold* - Methode (bei welcher Kanalöffnungen direkt erkannt werden, wenn die Ströme in der Einzelkanalspur größer als 50% des zuvor festgestellten Wertes der Einzelkanalamplituden sind), und wurde daher vorgezogen.

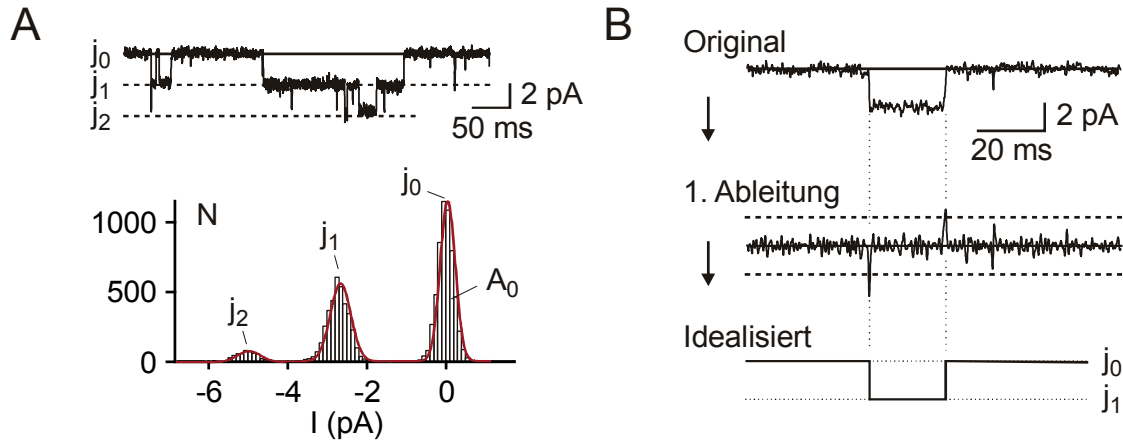


Abb. 2.6: **Analyse der Einzelkanalspuren.** A: Ausschnitt aus einer Einzelkanalmessung im *Outside-Out*-Modus (*oben*, -60 mV) mit geschlossenem Zustand ( $j_0$ ) oder einem ( $j_1$ ) bzw. zwei ( $j_2$ ) gleichzeitig geöffneten TRPC5-Kanälen. Das All-Points-Histogramm (*unten*) gibt die verschiedenen Offenzustände (Level  $j_x$ ) als Gauss-Verteilung wieder.  $A_0$ : Fläche unter der Gauss-Verteilung des geschlossenen Zustands. B: Funktionsweise des Leveldetektors. Die gefilterte Originalspur (*oben*) wird nach der Zeit abgeleitet. In der 1. Ableitung (*Mitte*) sind Levelübergänge als Spitzen zu sehen, die mit Hilfe von manuell festgelegten Schwellwerten (horizontale gestrichelte Linien) detektiert und der idealisierten Spur (*unten*) hinzugefügt werden.

Die idealisierten Spuren wurden nach der automatischen Idealisierung manuell überprüft und korrigiert. Öffnungen, die kürzer als 0,5 ms (etwas weniger als die *Rise Time* eines 1 kHz-Filters) waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für die Bestimmung der Öffnungsfrequenz wurden alle Öffnungsereignisse in einem Zeitintervall gezählt und durch die Größe des Intervalls dividiert. Da in vielen Einzelkanalmessungen mehrere Offenzustände erfasst werden mussten, wurde die mittlere Offenzeit mit Gleichung G2.14 ermittelt, die von Fenwick *et al.* (1982) als Alternative zu einer Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion entworfen wurde, und deren generelle Anwendbarkeit bestätigt ist (Ramanan *et al.*, 1992). Die Werte für die Offenwahrscheinlichkeit und für die Öffnungsfrequenz sind abhängig von der Anzahl der Kanäle, die sich während einer Messung im Patch befinden. Um diese

$$t_o = \frac{\sum j t_j}{N} \quad \text{G2.14}$$

**Gleichung G2.14:** Berechnung der mittleren Offenzeiten.  $t_o$ : mittlere Offenzeit.  $j$ : Level.  $N$ : Anzahl aller Öffnungsereignisse (definiert als Übergang von Level  $j$  zu  $j+1$ ).  $t_j$ : Mittelwerte der Offenzeiten eines Levels.

Werte aus verschiedenen Messungen vergleichbarer zu machen, wurden sie auf die maximale Anzahl der Kanäle im Patch (entspricht der Anzahl an Levels  $j$ ) normiert.

## 2.5. Molekulare Modelle

Sequenzvergleiche zwischen Proteinen wurden mithilfe des ClustalW-Algorithmus oder manuell in DNASTar (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die bekannten Röntgenstrukturen von  $K^+$ -Kanälen wurden als PDB-Dateien aus der RCSB-Datenbank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org), Berman *et al.*, 2000) bezogen. Der Strukturvergleich zwischen TRPC5 und KcsA im Diskussionsteil wurde mit Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006) durchgeführt. Alle Abbildungen, die die dreidimensionale Struktur von Kanälen zeigen, wurden in RasMol 2.7.4.2 (Sayle & Milner-White, 1995, Bernstein, 2000) bearbeitet, und als GIF-Datei exportiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ströme durch TRPC5

##### 3.1.1. Ganzzell-Ströme durch TRPC5

Um TRPC5 biophysikalisch zu charakterisieren, wurden Patch-Clamp-Messungen im *Whole-Cell*-Modus an HEK293-Zellen durchgeführt, die die cDNA der Maus-Variante von TRPC5 transient überexprimierten. In diesem System bildet TRPC5 funktionelle Ionenkanäle, die in der Plasmamembran lokalisiert sind und durch PLC-abhängige Signalwege aktiviert werden können (Schaefer *et al.*, 2000). Die Infusion von  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , einem unspezifischen Aktivator aller G-Proteine, über die Patch-Pipette ins Cytosol führte zu transienten Einwärtsströmen bei einem Haltepotential von  $-60\text{ mV}$  (Abb. 3.1A). Die Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V) dieser Ströme wurden standardmäßig durch Spannungsrampen gewonnen, und hatten einen für TRPC5 charakteristischen doppelt-rektifizierenden Verlauf, mit einem Umkehrpotential nahe  $0\text{ mV}$  und prominenten Einwärts- und Auswärtsströmen bei negativen bzw. positiven Potentialen sowie einem flachen Segment

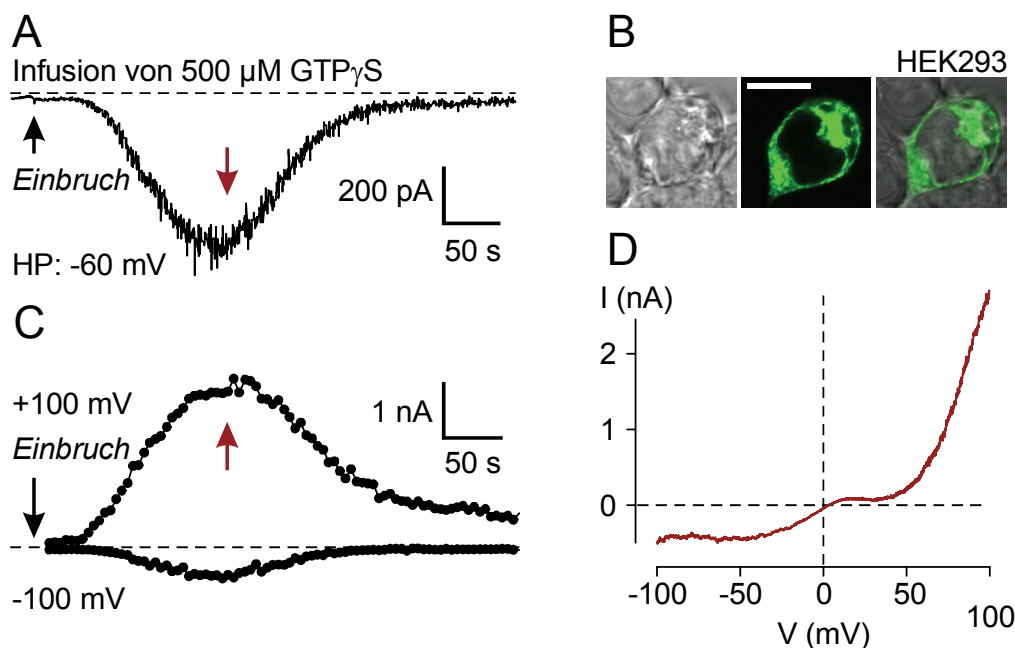


Abbildung 3.1: PLC-vermittelte Ganzzellströme durch TRPC5-Kanäle in transient transfizierten HEK293-Zellen nach  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Infusion ins Cytosol. A: Zeitverlauf bei einem Haltepotential von  $-60\text{ mV}$ . B: Konfokale Aufnahme einer HEK293-Zelle nach transienter Transfektion mit YFP-fusionierten TRPC5-Untereinheiten zeigt die Oberflächenexpression von TRPC5. Links, Differentielle Interferenzkontrast (DIC)-Aufnahme. Mitte, Laserscan-Aufnahme bei einer Wellenlänge von  $488\text{ nm}$ . Der weiße Balken entspricht einer Länge von  $20\ \mu\text{m}$ . Rechts, Überlagerung der DIC- und Laserscan-Aufnahmen. C: Aus Spannungsrampen ermittelter Zeitverlauf der in A gezeigten Messung bei Membranpotentialen von  $+100\text{ mV}$  und  $-100\text{ mV}$ . D: Repräsentative Strom-Spannungs-Beziehung von TRPC5, die durch eine Spannungsrampe während der in A und C gezeigten Messung (roter Pfeil) gewonnen wurde.

zwischen ca. 0 mV und +50 mV (Abb. 3.1D). In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Infusion von GTP $\gamma$ S über die Patch-Pipette weitere Aktivatoren des PLC-Signalweges benutzt, um TRPC5 zu aktivieren. Die Infusion von AlF $_4^-$  ins Cytosol (Strunecka et al., 2002) führte dabei ebenso wie GTP $\gamma$ S zur unspezifischen G-Protein-Aktivierung und damit zu transienten Strömen durch TRPC5. Eine weitere Möglichkeit, TRPC5 zu aktivieren, wurde durch die Coexpression des Kanals mit einem G $_q$ -Protein-koppelnden Rezeptor erreicht, der durch extrazelluläre Applikation von einem entsprechenden Liganden ebenfalls eine erhöhte PLC-Aktivität hervorruft. Der in dieser Arbeit verwendete Rezeptor war der Histamin-Rezeptor Subtyp 1 (H $_1$ R), der durch 100  $\mu$ M Histamin stimuliert wurde (für ein Review siehe Wettschureck & Offermanns, 2005). Ein weiteres Charakteristikum von TRPC5 ist dessen basale Aktivität, die kurz nach dem Einbrechen in HEK293-Zellen, die transient mit der cDNA des Kanals transfiziert wurden, beobachtet werden konnte und mit früheren Studien in Einklang steht (Schaefer et al., 2000, Yamada et al., 2000).

### 3.1.2. Einzelkanalströme durch TRPC5

In Patch-Clamp-Experimenten im *Outside-Out*-Modus zeigte TRPC5 charakteristische Einzelkanalströme, die ebenfalls ohne Applikation eines Aktivators des PLC-Signalweges eine kleine, aber messbare Basalaktivität aufwiesen (Abb. 3.2). Die durchschnittliche Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_o$ ) betrug bei -60 mV  $0,0235 \pm 0,0065$  ( $n = 15$ ), wobei die mittlere Offenzeit der Kanäle bei  $11,0 \pm 1,8$  ms lag ( $n = 14$ ) und im Mittel  $2,1 \pm 0,5$  Öffnungen pro Sekunde und Kanal stattfanden ( $n = 15$ ). Die Einzelkanalamplitude beim selben Haltepotential war  $-2,48 \pm 0,08$  pA ( $n = 15$ ). Diese Werte stimmen mit den Daten aus einer früheren Studie überein, in der basale Einzelkanalströme durch TRPC5 erstmals beschrieben wurden (Yamada et al., 2000). Dass es sich bei den Öffnungen tatsächlich um Ströme durch TRPC5, und nicht durch einen anderen Ionenkanal handelt, zeigten Messungen an untransfizierten HEK293-Zellen, in denen keine vergleichbaren Ströme aufgezeichnet wurden ( $n = 4$ , Daten nicht gezeigt). Ein weiteres Argument dafür, dass diese Ströme durch TRPC5 geleitet wurden, ist die *i*-*V*-Beziehung der Einzelkanalströme, die wie die *I*-*V*-Beziehung der Ganzzellströme doppelt-rektifizierend war und ein Umkehrpotential nahe 0 mV hatte (Abb. 3.2B).

Alle Einzelkanaluntersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an basal aktiven TRPC5-Kanälen vorgenommen, d.h. ohne zusätzliche Aktivierung des PLC-Signalweges. Ein Vergleich mit den Daten aus einer früheren Studie aus unserem Labor (Jung et al., 2003) zeigt, dass die Charakteristika der Einzelkanäle des PLC-aktivierten TRPC5 (100  $\mu$ M Histamin) denen des basal aktiven Kanals ähneln. Bei -60 mV war die Einzelkanalamplitude der mit Histamin aktivierten Kanäle bei Jung



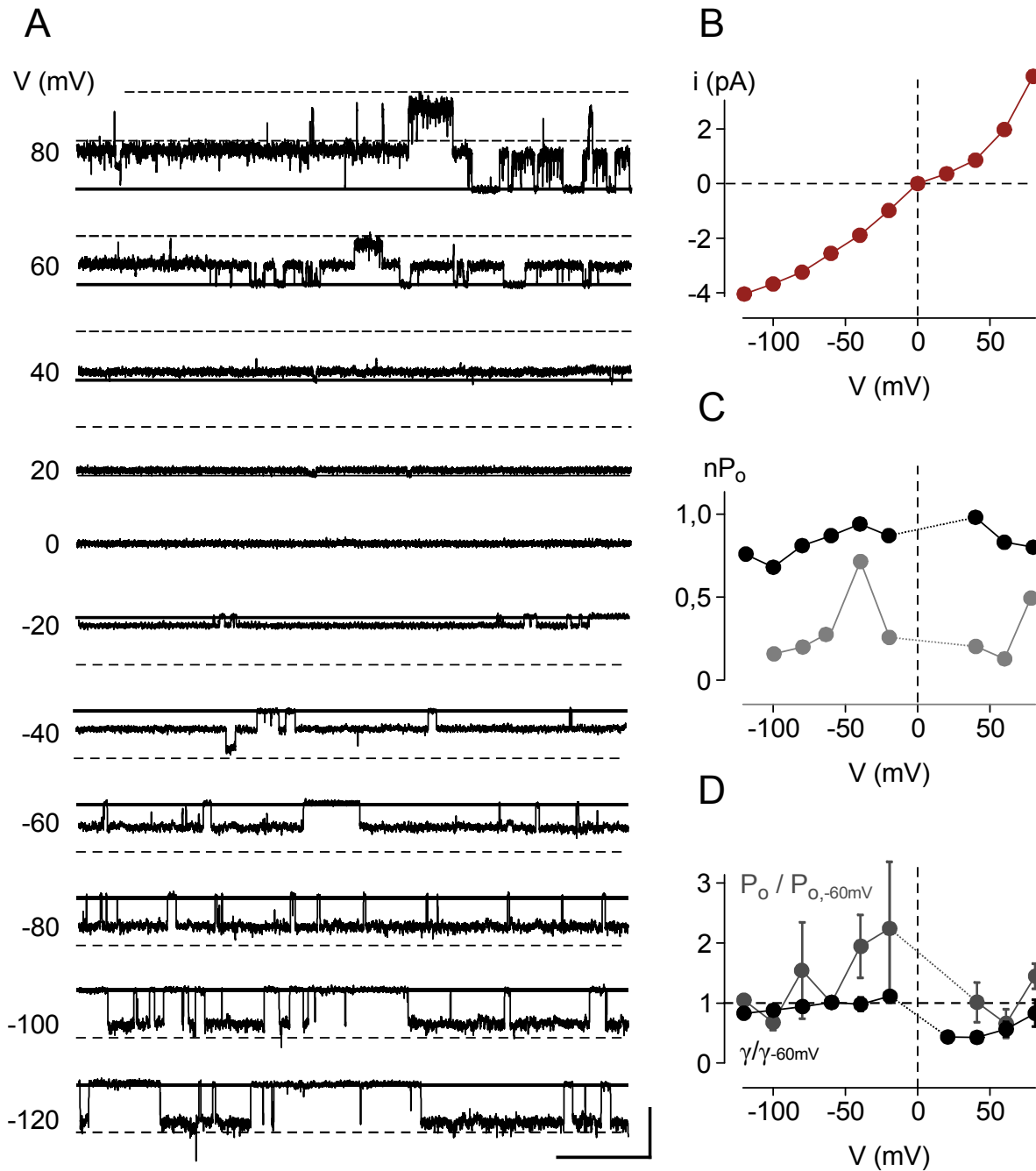


Abbildung 3.2: **Outside-Out-Messungen basaler Ströme durch transient überexprimierte TRPC5-Kanäle.** A: Originalspuren von TRPC5-Einzelkanälen bei den links angegebenen Haltepotentialen. Die kontinuierlichen schwarzen Linien markieren jeweils den geschlossenen Zustand. Die gestrichelten Linien sind jeweils 5 pA oberhalb/unterhalb der kontinuierlichen Linie eingezeichnet. B: Strom-Spannungs-Beziehung (i-V) der TRPC5-Einzelkanäle. Die einzelnen Punkte sind jeweils Mittelwerte aus bis zu fünf unabhängigen Spuren ( $\geq 20$ s). C: Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_0$ ) von TRPC5-Einzelkanälen in Abhängigkeit vom Membranpotential. Gezeigt sind exemplarisch die Daten aus zwei unabhängigen Messungen im *Outside-Out*-Modus. Man beachte den großen Unterschied in den  $nP_0$  der beiden Messungen. D: Normierte Offenwahrscheinlichkeit ( $P_0$ ) und Einzelkanalleitfähigkeit („chord conductance“;  $\gamma$ ) von TRPC5 in Abhängigkeit vom Membranpotential. Die einzelnen Werte in einer Messung sind jeweils auf den Wert bei -60 mV normiert, um den Einfluss der schwankenden Anzahl an Kanälen im Patch zu neutralisieren. Während die normierte  $P_0$  stark streute, wies die Einzelkanalleitfähigkeit nur einen sehr kleinen Fehler auf. Skalierung: 500 ms, 5 pA

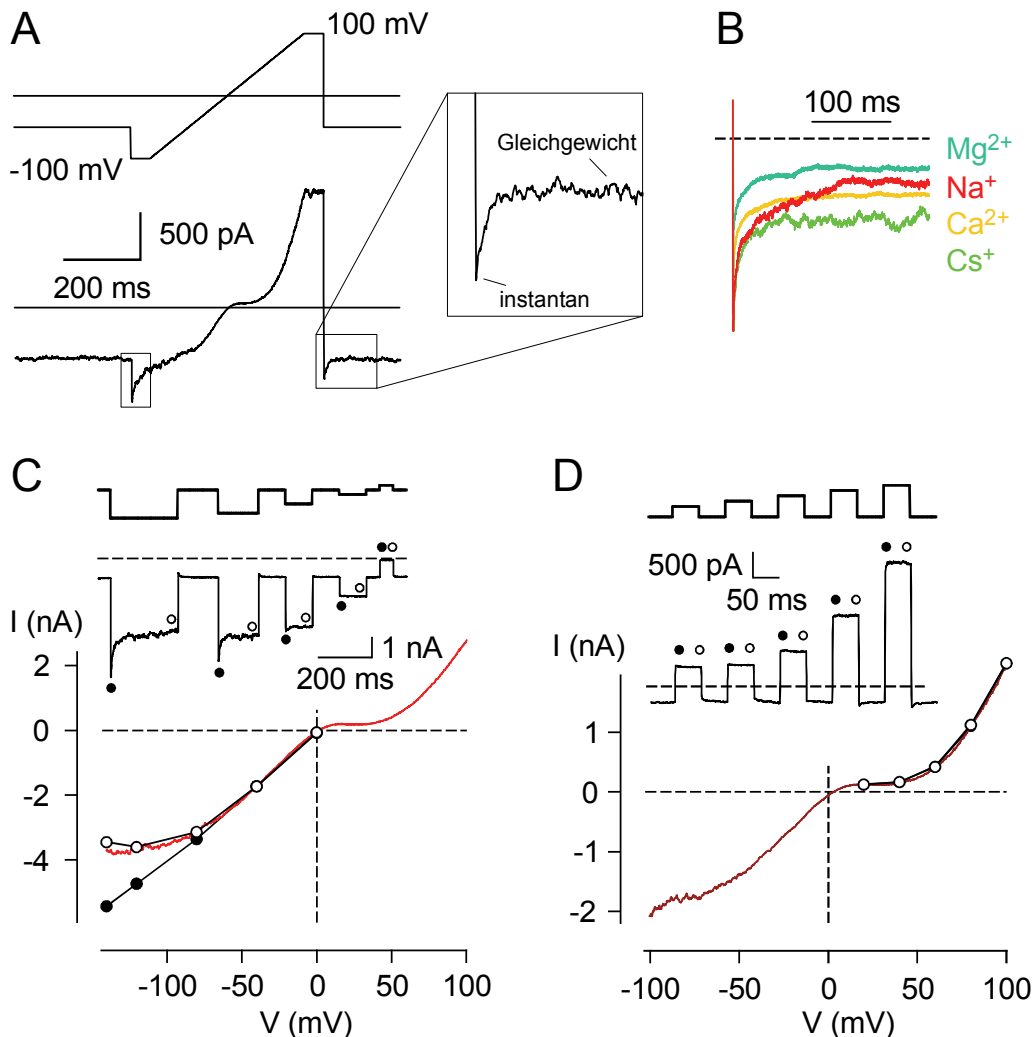
*et al.* (2003) durchschnittlich  $-2,48 \pm 0,07$  pA ( $n = 12$ ,  $p = 0,9868$  vgl. basal) und die mittlere Offenzeit betrug  $8,8 \pm 3,0$  ms ( $n = 8$ ,  $p = 0,5041$  vgl. basal). Der einzige Unterschied lag in der  $nP_o$ , die mit  $0,0842 \pm 0,0522$  ( $n = 5$ ) viermal größer war als bei den in dieser Arbeit gemessenen basalen Strömen. Aufgrund der großen Streuung der Werte war dies jedoch nicht signifikant ( $p = 0,0632$ ). Wie unterschiedlich die basale Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_o$ ) in den einzelnen Experimenten war, zeigt Abbildung 3.2C exemplarisch für zwei unabhängige Messungen. Der Hauptgrund für die große Divergenz in verschiedenen Experimenten lag dabei nicht ausschließlich an der unterschiedlichen Anzahl der TRPC5-Kanäle ( $n$ ) in den Membran-Patches. Da sich durch die Normierung der  $nP_o$  bei verschiedenen Potentialen auf die Werte bei  $-60$  mV dieses Kriterium ( $n$ ) herauskürzt (Abb. 3.2D,  $P_o/P_{o,-60mV}$ ), hätte in diesem Fall die Streuung deutlich geringer ausfallen müssen. Weil dies jedoch nicht der Fall war, ist davon auszugehen, dass die spontane Aktivität von TRPC5 von Faktoren, die von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt sind, determiniert wird. Die Normierung der Einzelkanalleitfähigkeit, die aus dem Einzelkanalstrom (Abb. 3.2B) ermittelt wurde, produzierte hingegen nur sehr kleine Fehler (Abb. 3.2D,  $\gamma/\gamma_{-60mV}$ ). Die normierte Leitfähigkeit war über einen großen Spannungsbereich konstant, jedoch bei positiven Potentialen ( $+20$  mV,  $+40$  mV,  $+60$  mV) deutlich abgeschwächt. Dieser Effekt ist einem intrazellulären Block durch  $Mg^{2+}$  zuzuschreiben, der bereits in anderen Studien im Detail untersucht wurde (Schaefer *et al.*, 2000, Obukhov & Nowycky, 2005).

## 3.2. Die Spannungsabhängigkeit der TRPC-Kanäle

### 3.2.1. Spannungsabhängige Komponenten der Ströme durch TRPC5

Für einige Kanäle aus der TRPV- und TRPM-Familie ist bekannt, dass sie im unstimulierten Zustand durch starke Membrandepolarisation spannungsabhängig aktiviert werden können. Umgekehrt ist die Temperatur- bzw.  $Ca^{2+}$ -abhängige Stimulation dieser Kanäle an eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativeren Membranpotentialen gekoppelt (Nilius *et al.*, 2003, Voets *et al.*, 2004, für ein Review siehe Nilius *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob TRPC5 ebenfalls spannungsabhängig reguliert wird, wurden *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Messungen im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Die Applikation von  $100 \mu M$  Histamin führte erwartungsgemäß zu transienten Strömen durch TRPC5. Dass diese Ströme spannungsabhängige Komponenten besitzen, fiel bereits bei der standardmäßigen Applikation von Spannungsrampen auf, welche von (hyperpolarisierenden) Spannungssprüngen flankiert wurden (Abb. 3.3A). Infolge dieser Spannungssprünge (von  $-60$  mV auf  $-100$  mV bzw. von  $+100$  mV auf  $-60$  mV) war ein zeitabhängiger Abfall der Ströme durch TRPC5 auf ein Gleichgewichtsniveau zu verzeichnen.

Dieses Verhalten deutete auf eine spannungsabhängige Schließung der Kanäle bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen hin („Tailströme“), könnte jedoch auch durch die spannungsabhängige Bindung eines Kations in der Pore (*open channel*



**Abbildung 3.3: Spannungsabhängige Komponenten der G-Protein-aktivierten Ströme durch TRPC5.** A: Protokoll einer Spannungsrampe und korrespondierende Ströme durch TRPC5. Das Rampenprotokoll beinhaltete an zwei Stellen hyperpolarisierende Spannungssprünge, welche einen zeitabhängigen Abfall der Ströme durch TRPC5 verursachten (Boxen). B: Der zeitabhängige Abfall der Ströme fand unter monoionischen Bedingungen in ähnlicher Weise statt wie unter multiionischen (A). Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um Tailströme handelte. Gezeigt sind Ausschnitte von TRPC5-Strömen kurz nach dem Spannungssprung von +100 mV auf -60 mV am Ende der Rampenprotokolle (siehe A) entweder in 150 mM Na<sup>+</sup> bzw. Cs<sup>+</sup>, oder in 100 mM Mg<sup>2+</sup> bzw. Ca<sup>2+</sup>. Die Ströme sind auf ihren Wert kurz nach dem Spannungssprung normiert. C: Die Applikation von hyperpolarisierenden Spannungspulsen (von -20 mV auf -140, -120, -80, -40, 0 mV) zum Zeitpunkt der größten Aktivierung mit Histamin rief Tailströme durch TRPC5 hervor (*Inset*), deren instantane I-V-Beziehung (●) linear war, und deren Gleichgewichtsströme (○) mit den aus Spannungsrampen gewonnenen I-V-Beziehungen übereinstimmten. D: Die instantanen und die Gleichgewichtsströme von TRPC5 nach depolarisierenden Spannungspulsen (von -20 mV auf +20, +40, +60, +80 und +100 mV, *Inset*) unterschieden sich nur geringfügig (siehe Text).

*block*) hervorgerufen werden. Sollte die letztere Möglichkeit zutreffen, kämen die in der Standard-Extrazellulärlösung präsenten Kationen ( $\text{Na}^+$ : 140 mM,  $\text{Cs}^+$ : 5 mM,  $\text{Mg}^{2+}$ : 1 mM,  $\text{Ca}^{2+}$ : 2 mM) als mögliche Porenblocker von TRPC5 infrage. Um dies zu testen, wurden Experimente unter monoionischen Bedingungen, d.h. mit extrazellulären Lösungen, die lediglich eines dieser Kationen und  $\text{NMDG}^+$  enthielten (5 mM bis 140 mM  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Cs}^+$  oder 5 mM bis 100 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ ), durchgeführt. Wie Abbildung 3.3B zeigt, kam es mit dieser Versuchsanordnung jedoch nach hyperpolarisierenden Spannungssprüngen ebenfalls zu einem zeitabhängigen Abfall der TRPC5-Ströme, der dem in Standard-Extrazellulärlösung äußerst ähnlich war. Daher ist ein kationischer Block der Pore die unwahrscheinlichere Erklärung für die oben beschriebenen Effekte. Das Abfallen der PLC-abhängig aktivierten Ströme durch TRPC5 nach depolarisierenden Spannungssprüngen beruht demnach offensichtlich auf einer spannungsabhängigen Schließung der Kanäle.

Um die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 systematisch zu charakterisieren, wurden zunächst Spannungspulse von -20 mV auf verschiedene negativere Potentiale (-140, -120, -80, -40 mV,  $n = 9$ ) appliziert. Wie zu erwarten war, kam es infolge der hyperpolarisierenden Spannungssprünge zu Tailströmen, welche durch eine rasche instantane Komponente und den Abfall auf ein Gleichgewichtsniveau definiert sind (Abb. 3.3.A, Erläuterungen siehe Kap. 2.4.2.3.). Sowohl die Amplituden der instantanen Ströme als auch die Geschwindigkeit ihres Abfalls auf den Gleichgewichtsstrom waren dabei abhängig von der Spannung der Pulse (Abb. 3.3C). Die I-V-Beziehungen der instantanen Ströme hatten einen nahezu linearen Verlauf zwischen -140 und 0 mV ( $\bullet$ , Abb. 3.3C). Diese spiegeln die i-V-Beziehungen der TRPC5-Einzelkanäle wider, welche im selben Spannungsbereich ebenfalls gleichförmig verlaufen (siehe Kap. 3.1.2 und Jung et al., 2003). Kurz nach den Spannungssprüngen fielen die instantanen Ströme durch TRPC5 infolge der spannungsabhängigen Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit auf ein Gleichgewichtsniveau ab ( $\circ$ , Abb. 3.3C). Die I-V-Beziehungen dieser Gleichgewichtsströme entsprachen jeweils den I-V-Beziehungen, die wenige Sekunden vor oder nach dem Puls-Protokoll durch Spannungsrampen gewonnen wurden. Somit begründet sich der bei negativen Potentialen gekrümmte Verlauf der I-V-Beziehungen von TRPC5 durch eine spannungsabhängige Schließung der Kanäle. Bei depolarisierenden Spannungspulsen von -20 mV auf +20, +40, +60, +80 oder +100 mV war die Differenz zwischen den instantanen und Gleichgewichtsströmen jeweils sehr gering ( $n = 3$ , Abb. 3.3D). Der Grund hierfür könnte einerseits darin liegen, dass sich die Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_o$ ) bei -20 mV tatsächlich kaum von denen bei höheren Potentialen unterschieden. Andererseits kommt in diesem Spannungsbereich auch der  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Block von TRPC5 zum Tragen (Schaefer et al., 2000, Obukhov & Nowycky, 2005) und könnte mit dem spannungsabhängigen Öffnungsverhalten der Kanäle interferieren.

### 3.2.2. Wie ändert sich Spannungsabhängigkeit von TRPC5 während seiner PLC-vermittelten Aktivierung?

Im vorangegangenen Abschnitt (Kap. 3.2.1) wurde gezeigt, dass die Ströme durch TRPC5 zum Zeitpunkt der maximalen PLC-vermittelten Aktivierung spannungsabhängige Charakteristika aufweisen. Es stellte sich nun die Frage, wie sich die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 während geringerer PLC-abhängiger Aktivität verhält. Die Experimente, die hierfür durchgeführt wurden, unterschieden sich im Vergleich zu den in Kapitel 3.2.1 gezeigten Versuchen in zweierlei Hinsicht: Zum einen erfolgte die PLC-abhängige Aktivierung von TRPC5 durch Infusion von  $GTP\gamma S$  über die Patch-Pipette ins Cytosol. Die Stimulation des PLC-Signalweges verläuft in diesen Fällen meist langsamer als durch die Aktivierung von  $G_q$ -Proteinkoppelnden Rezeptoren, und ermöglicht so die Applikation mehrerer Spannungsprotokolle im Zeitraum zwischen basaler und maximaler Kanalaktivität (Abb. 3.4B, *Inset*). Zum anderen wurden die Spannungspulse verändert, welche hier von einem deutlich negativeren Potential als in Kapitel 3.2.1 ausgingen (-120 mV), und außerdem einen größeren Spannungsbereich abdeckten (von -120 mV bis +200 mV, siehe Abb. 3.4A, *Inset*).

Zum Zeitpunkt der größten PLC-abhängigen Aktivierung (Abb. 3.4A, *rechts*) zeigte TRPC5 auch mit den modifizierten Versuchsprotokollen ähnliche Charakteristika wie die im vorigen Abschnitt beschriebenen. Die spannungsabhängige Zunahme der Ströme kurz nach depolarisierenden Sprüngen am Anfang der Spannungspulse war ebenfalls sehr schwach ausgeprägt (vgl. Abb. 3.3D), und die I-V-Beziehungen der Gleichgewichtsströme wiesen deutliche Ähnlichkeiten zu den doppelt-rektifizierenden, mit Spannungsrampen gewonnenen I-V-Beziehungen von TRPC5 auf (Abb. 3.4B, ●). Infolge von hyperpolarisierenden Spannungssprüngen am Ende der Pulse kam es wie bei den im vorigen Abschnitt gezeigten Daten zu Tailströmen durch TRPC5 (Abb. 3.4A, *rechts*). Im Gegensatz zu Kapitel 3.2.1 variierten hier die Potentiale jedoch vor den hyperpolarisierenden Spannungssprüngen (zwischen -120 mV und +200 mV, siehe Abb. 3.4A, *Inset*), und hatten danach jeweils den gleichen Wert (-120 mV). Darum sind die instantanen Komponenten der resultierenden Tailströme nicht proportional zum Einzelkanalstrom  $i$ , sondern vielmehr zur Offenwahrscheinlichkeit  $nP_o$  von TRPC5 (Erläuterungen siehe Kap. 2.4.2.3.). Abbildung 3.4C zeigt die Beziehung der Tailströme, welche mittels Division durch das Membranpotential (-120 mV) in die entsprechende Leitfähigkeit ( $g$ ) umgerechnet wurden, zum angelegten Potential vor den Spannungssprüngen. Die  $g$ -V-Beziehung zum Zeitpunkt der größten PLC-abhängigen Aktivierung (●) weist eine deutliche Spannungsabhängigkeit auf, zu erkennen am über den gesamten untersuchten Potentialbereich kontinuierlichen Anstieg, der lediglich zwischen 0 mV und +80 mV leicht unterbrochen wird. Interessanterweise tritt gerade in diesem Bereich der  $Mg^{2+}$ -abhängige Block von TRPC5 auf, dessen

Ursache eigentlich eine Reduktion der Einzelkanalamplitude ( $i$ ) ist (Schaefer *et al.*, 2000, Obukhov & Nowycky, 2005). Da jedoch mit dem verwendeten Spannungsprotokoll die  $g$ - $V$ -Beziehungen nicht von der Einzelkanalamplitude abhängen, würde der  $Mg^{2+}$ -abhängige Block bei alleinigen Effekten auf den Einzelkanalstrom hier nicht sichtbar sein.

Wie zum Zeitpunkt der größten PLC-abhängigen Aktivierung wiesen die Ströme durch TRPC5 auch während geringerer PLC-abhängiger Aktivität spannungsabhängige Charakteristika auf (Abb. 3.4A, *links* und *Mitte*). Die Gleichgewichtsströme (Abb. 3.4B,  $\square$ ,  $\circ$ ) waren doppelt-rektifizierend, was ihre Identität (TRPC5) bestätigte. Die  $g$ - $V$ -Beziehungen verliefen im untersuchten Spannungsbereich ansteigend (Abb. 3.4C,  $\square$ ,  $\circ$ ), und sind damit konsistent mit den zuvor beschriebenen Daten, welche auf eine Spannungsabhängigkeit von TRPC5 hinwiesen.

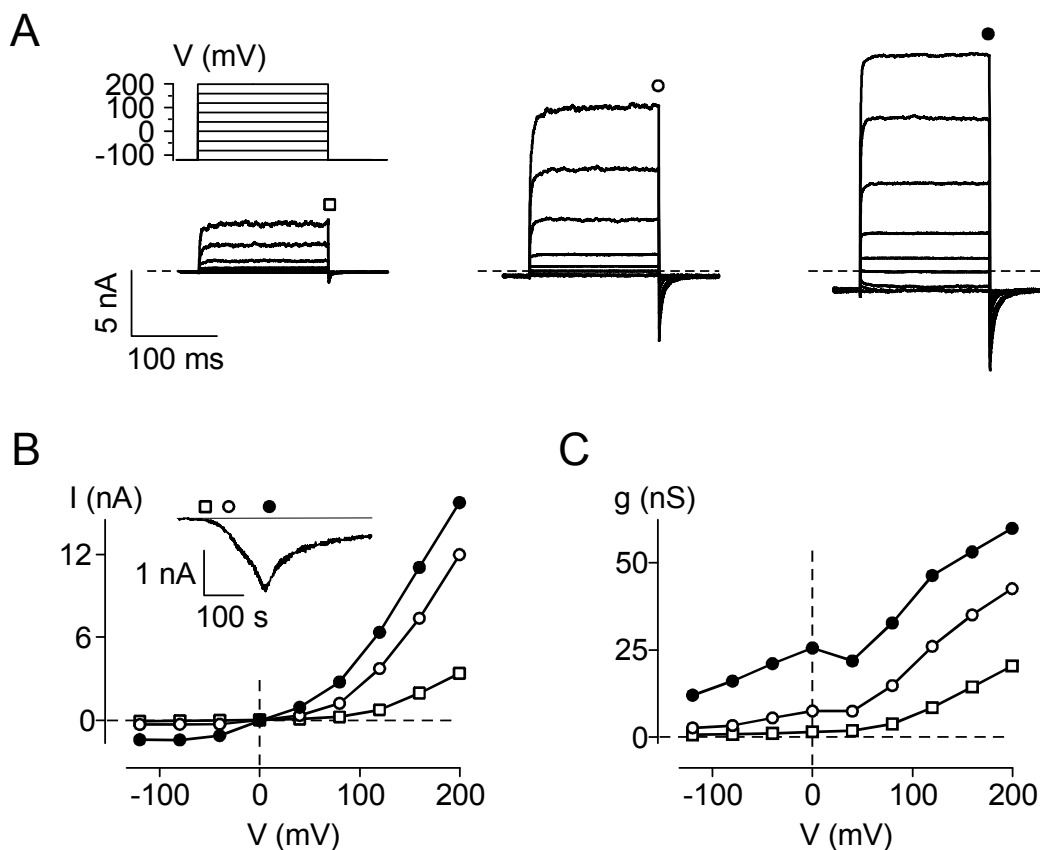


Abbildung 3.4: **Spannungsabhängigkeit von TRPC5 während der G-Protein-vermittelten Aktivierung.** A: Ströme durch TRPC5 während Spannungspulsen von -120 mV auf -80, -40, 0, +40, +80, +120, +160 und +200 mV zu verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung durch  $GTP\gamma S$ -Infusion über die Patch-Pipette ins Cytosol von transfizierten HEK293-Zellen. Die gestrichelten Linien markieren 0 nA, die Symbole den in B und C betrachteten Spannungssprung. *Inset*, Appliziertes Spannungsprotokoll. B: I-V-Beziehungen der in A gezeigten Gleichgewichtsströme durch TRPC5 (vor dem in A markierten, hyperpolarisierenden Spannungssprung). *Inset*, Zeitverlauf der Messung bei -60 mV. Die Symbole kennzeichnen den Zeitpunkt, an dem die in A gezeigten Ströme aufgezeichnet wurden. C:  $g$ - $V$ -Beziehungen der in A abgebildeten instantanen Ströme durch TRPC5 (kurz nach dem Spannungssprung). Der hier gezeigte Versuch ist repräsentativ für insgesamt 6 unabhängige Experimente.

Betrachtet man die I-V-Beziehungen der Gleichgewichtsströme von TRPC5 zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments (Abb. 3.4B), so fällt auf, dass die Ströme mit steigender PLC-abhängiger Aktivität nicht gleichmäßig zunehmen. Ein Anstieg der Gleichgewichtsströme erfolgte zunächst bei positiven Potentialen (Abb. 3.4B,  $\square \rightarrow \circ$ ), während die Ströme bei negativen Potentialen erst zu späteren Zeitpunkten, bei sehr hoher PLC-abhängiger Aktivität, zunahmen (Abb. 3.4B,  $\circ \rightarrow \bullet$ ). Wie Abbildung 3.4C erkennen lässt, ist dieser Effekt möglicherweise durch eine Verschiebung der g-V-Beziehung von TRPC5 zu negativeren Potentialen infolge seiner (PLC-abhängigen) Aktivierung zu erklären. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für andere spannungsabhängige TRP-Kanäle beschrieben (Voets *et al.*, 2004, Nilius *et al.*, 2005). Für TRPV1 und TRPM8 wurde gezeigt, dass es dabei infolge der liganden- oder temperaturabhängigen Aktivierung zu einer Linksverschiebung der sigmoidalen g-V-Beziehungen ohne Änderung der minimalen und maximalen Leitfähigkeit ( $g_{\min}$  und  $g_{\max}$ ) kommt. Im Gegensatz zu TRPV1 oder TRPM8 sind die in Abbildung 3.4C dargestellten g-V-Beziehungen von TRPC5 jedoch nicht sigmoidal, sondern steigen, abgesehen vom Bereich des  $Mg^{2+}$ -abhängigen Blocks, über den untersuchten Spannungsbereich kontinuierlich an. Es ist daher davon auszugehen, dass die Sättigung der g-V-Beziehungen, und somit die maximale Leitfähigkeit ( $g_{\max}$ ), von TRPC5 hier jeweils außerhalb des untersuchten Spannungsbereichs (bei Potentialen größer als +200 mV) lag. Ob  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  infolge der PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC5 tatsächlich konstant bleiben oder veränderlich sind, entzog sich somit der experimentellen Beobachtung.

Um die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 unter den gegebenen Umständen näher zu beschreiben, wurde zunächst angenommen, dass sich  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  sowie die *gating charge*  $z$  infolge der PLC-abhängigen Aktivierung des Kanals nicht verändern (*Two-State-Model*, Abb. 3.5 und Kap. 2.4.2.3). Die Ermittlung der Kenngrößen der Spannungsabhängigkeit von TRPC5 konnte somit durch sigmoidales *Fitting* seiner g-V-Beziehungen erfolgen, nachdem ein geeigneter Wert für  $g_{\max}$  durch Abschätzen gefunden wurde. Abbildung 3.5C zeigt diese Vorgehensweise am Beispiel der zuvor beschriebenen g-V-Beziehungen (siehe Abb. 3.4C). Für die dort dargestellten, sigmoidalen Fits wurden jeweils 0 nS als minimale, und 60 nS (grüne Kurven) bzw. 72 nS (rote Kurven) als maximale Leitfähigkeit angenommen. Es ergab sich mit  $g_{\max} = 60$  nS eine *gating charge* von 0,3, wobei sich  $V_{1/2}$  im Verlaufe der PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC5 von +380 mV auf  $\pm 0$  mV verringerte. Basierend auf einer größer abgeschätzten maximalen Leitfähigkeit ( $g_{\max} = 72$  nS) wurde hingegen eine kleinere *gating charge* ( $z = 0.25$ ) ermittelt, und die hypothetischen g-V-Beziehungen (Abb. 3.5C, rote Fits) verschoben sich von  $V_{1/2} = +400$  mV auf  $V_{1/2} = +45$  mV. Aus noch größer gewählten Werten für  $g_{\max}$  ( $> 72$  nS) resultierten tendenziell noch kleinere *gating charges*

(< 0.25), während die Werte für  $V_{1/2}$ , im Vergleich zu kleineren Schätzwerten für  $g_{\max}$ , jeweils positiver waren (z.B. mit  $g_{\max} = 120$  nS:  $z = 0,2$  und Verschiebung von  $V_{1/2} = +570$  mV auf +160 mV, nicht gezeigt). Grundsätzlich ergibt sich daher für TRPC5 mit einem *Two-State-Model* eine *gating charge* von höchstens 0,3, was ein deutlich geringerer Wert als bei anderen spannungsabhängigen TRP-Kanälen ist (z.B. TRPV1:  $z = 0,71$  oder TRPM8:  $z = 0,89$ , beides aus Voets et al., 2004). Dies deutet auf eine geringere Ladungsdichte im Spannungssensor von TRPC5 hin und damit letztendlich auf eine schwächere Spannungsabhängigkeit seines *Gatings*.

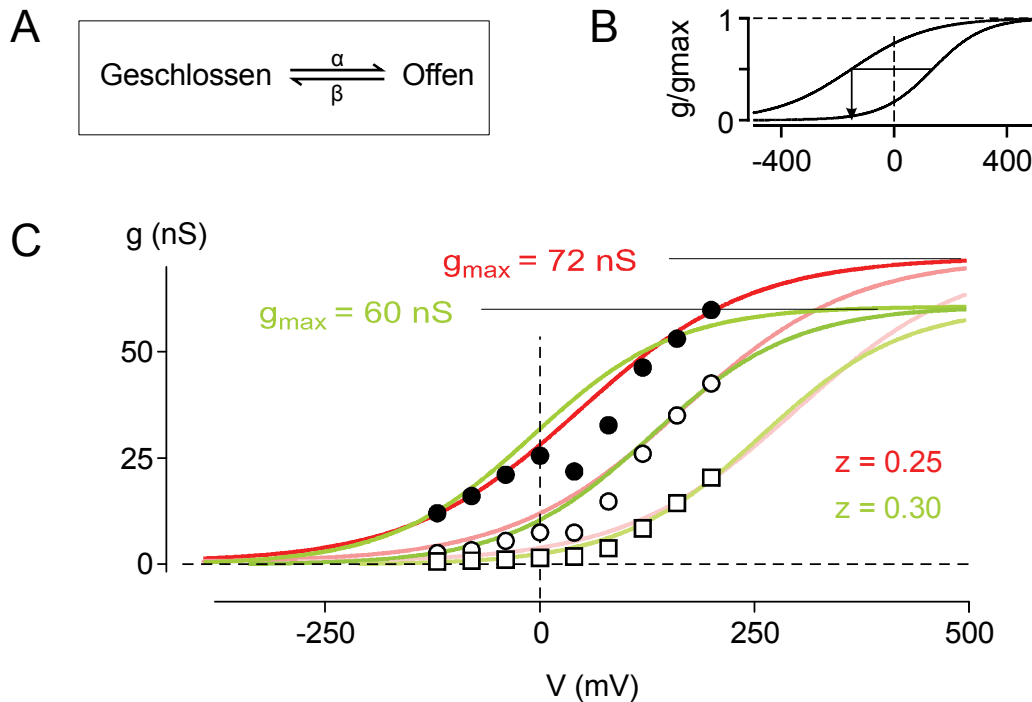


Abbildung 3.5: **Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von TRPC5 mit einem *Two-State-Model*.** A: Schema des einfachsten kinetischen *Gating*modells, bei dem ein Kanal lediglich zwei Zustände (offen oder geschlossen) besitzt, welche über die Geschwindigkeitskonstanten  $\alpha$  und  $\beta$  miteinander zusammenhängen. B: Hypothetisches Verhalten der  $g$ - $V$ -Beziehungen von TRPC5 (normiert auf  $g_{\max}$ ) gemäß dem *Two-State-Model*. Der schwarze Pfeil symbolisiert die Verschiebung von  $V_{1/2}$  zu negativeren Potentialen. C: Die  $g$ - $V$ -Beziehungen von TRPC5 bei unterschiedlicher PLC-abhängiger Aktivität aus Abbildung 3.4C ( $\square$ ,  $\circ$ ,  $\bullet$ ) wurden mit Gleichung G2.9 (siehe Kap. 2.4.2.3) gemäß dem *Two-State-Model* gefittet. Mit  $g_{\max} = 60$  nS (grüne Kurven) ergab sich eine *gating charge* von  $z = 0,3$ , und mit  $g_{\max} = 72$  nS (rote Kurven) eine *gating charge* von  $z = 0,25$ .

Die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von TRPC5 mit einem *Two-State-Model* beruht auf der Annahme, dass seine minimale bzw. maximale Leitfähigkeit unabhängig von der PLC-Aktivität ist. Es soll an dieser Stelle nochmals erwähnt werden, dass es aufgrund der fehlenden Sättigung der  $g$ - $V$ -Beziehungen (Abb. 3.5C) nicht möglich war, diese Annahme experimentell zu bestätigen. Es besteht demnach weiterhin die Möglichkeit, dass sich  $g_{\min}$  bzw.  $g_{\max}$  infolge der PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC5 verändern, und somit seine Spannungs-



abhängigkeit adäquater durch andere Gating-Modelle beschrieben wird. Untersuchungen der Schließkinetik des Kanals deuten tatsächlich hierauf hin (Abb. 3.6). Prinzipiell ließen sich die durch hyperpolarisierende Spannungssprünge hervorgerufenen Tailströme durch TRPC5 zwar, gemäß einem *Two-State-Model*, mithilfe von monoexponentiellen Funktionen beschreiben (Abb. 3.6A). Die Übereinstimmung dieser Tailströme mit doppel-exponentiellen Funktionen war jedoch in allen Fällen größer (Abb. 3.6B). Somit ist anzunehmen, dass mehr als lediglich zwei Kanalzustände (vgl. Abb. 3.5A) erforderlich sein werden, um das spannungsabhängige Verhalten von TRPC5 präzise zu erfassen. Das im vorangegangenen Absatz angewendete *Two-State-Model* sollte daher als grob vereinfachtes Modell des *Gatings* von TRPC5 aufgefasst werden.

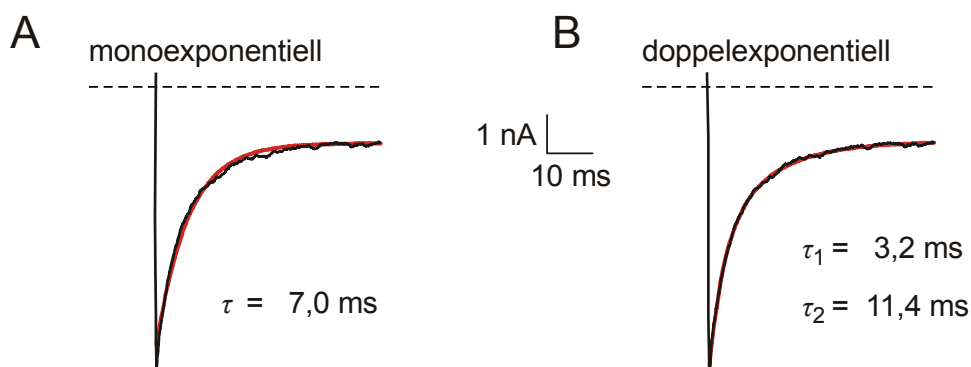


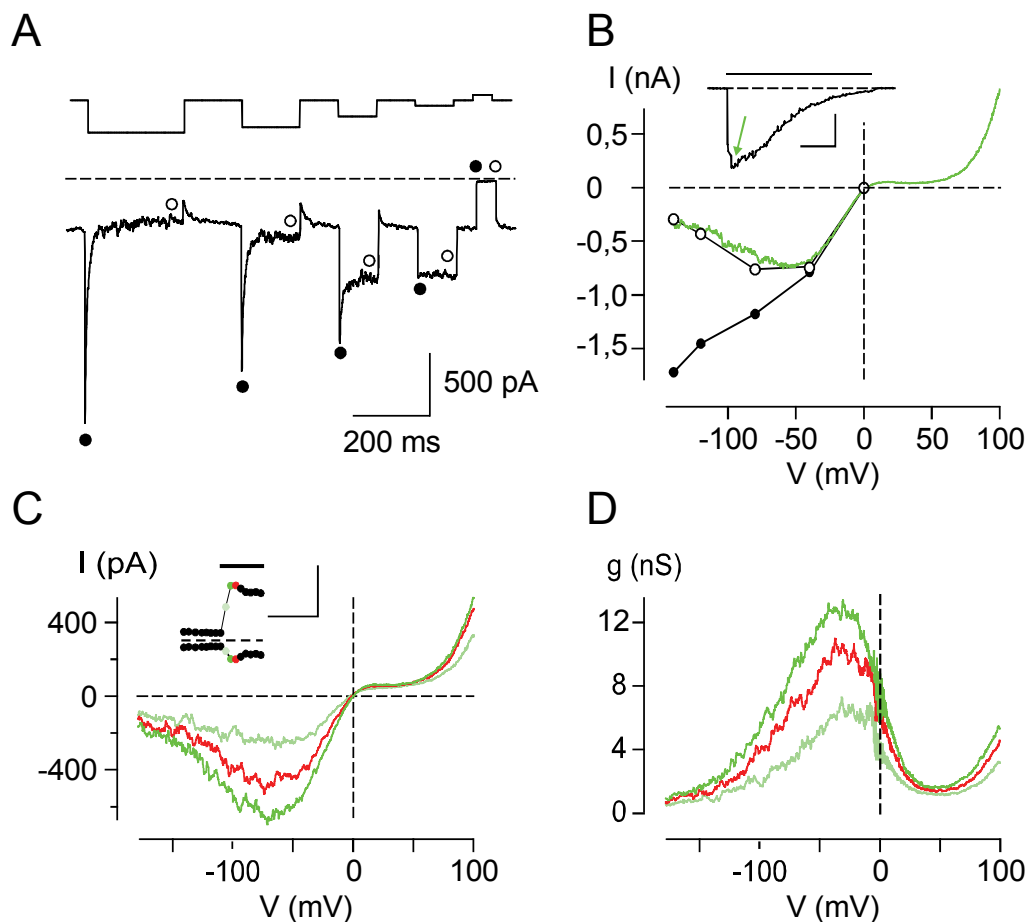
Abbildung 3.6: **Verlauf der spannungsabhängigen Abnahme der instantanen Ströme nach hyperpolarisierenden Sprüngen.** Die Deaktivierung von TRPC5 nach hyperpolarisierenden Spannungssprüngen wird durch eine doppel-exponentielle Funktion (B) adäquater wiedergegeben als durch eine monoexponentielle (A). A und B zeigen beide den gleichen Tailstrom, der nach einem Spannungssprung von +200 mV auf -120 mV aufgezeichnet wurde.

### 3.2.3. Die Spannungsabhängigkeit anderer Kanäle aus der TRPC-Familie

#### 3.2.3.1. TRPC4

Basierend auf Sequenzvergleichen innerhalb der Familie der TRP-Kanäle weist TRPC4 die größten Ähnlichkeiten zu TRPC5 auf (für ein Review siehe Clapham *et al.*, 2001). Die Stimulation von  $G_q$ -koppelnden Signalwegen mit Histamin führte in HEK293-Zellen, die mit cDNA von TRPC4 und  $H_1R$  transfiziert wurden, zu transienten Einwärtsströmen durch TRPC4 (-60 mV, Abb. 3.7B, *Inset*). Auch TRPC4 zeigte Tailströme infolge hyperpolarisierender Spannungssprünge (von -20 mV auf Potentiale zwischen 0 mV und -160 mV,  $n = 5$ , Abb. 3.7A). Die I-V-Beziehungen der instantanen Komponenten waren dabei nahezu linear und die Gleichgewichtsströme entsprachen den aus Spannungsrampen gewonnenen I-V-Beziehungen (Abb. 3.7B). Im Gegensatz zu TRPC5 war die Deaktivierung der Ströme infolge von Spannungssprüngen jedoch viel stärker ausgeprägt. Die in

Abbildung 3.7D dargestellten g-V-Beziehungen von TRPC4, die aus den Gleichgewichtsströmen (I-V-Beziehungen, Abb. 3.7C) gewonnen wurden, machen diesen Unterschied deutlich. Auch während der maximalen PLC-abhängigen Aktivierung lag die Leitfähigkeit von TRPC4 bei -160 mV unter 1 nS und damit nahe einer  $g_{\min}$  von 0 nS. Zwischen -160 mV und ca. -40 mV stiegen diese dann kontinuierlich auf



**Abbildung 3.7: Spannungsabhängigkeit der Ströme durch TRPC4.** A: Die Applikation von hyperpolarisierenden Spannungspulsen (von -20 mV auf -140, -120, -80, -40, 0 mV) auf Ströme durch TRPC4, die mit Histamin aktiviert wurden, rief wie bei TRPC5 Tailströme hervor. *Inset*, Pulsprotokoll. B: Die instantanen Komponenten der Tailströme in A (●) wiesen eine lineare I-V-Beziehung auf, während die Gleichgewichtsströme (○) mit den aus Spannungsrampen gewonnenen I-V-Beziehungen übereinstimmten. *Inset*, Zeitverlauf der in A und B gezeigten Messung. Der grüne Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem die dargestellten Spannungsprotokolle appliziert wurden, der schwarze Balken kennzeichnet die Dauer der Applikation von 100  $\mu$ M Histamin. C: Durch Spannungsrampen gewonnene I-V-Beziehungen von TRPC4 zu verschiedenen Zeitpunkten der PLC-abhängigen Aktivierung. *Inset*, Zeitverlauf der Messung bei  $\pm 100$  mV. Die grünen und roten Punkte markieren die Zeitpunkte, an denen die I-V-Beziehungen aufgezeichnet wurden, der schwarze Balken kennzeichnet die Dauer der Applikation von 100  $\mu$ M Histamin. D: g-V-Beziehungen von TRPC4, die aus den I-V-Beziehungen in C ermittelt wurden. Zu beachten sind die geringe Leitfähigkeit bei -160 mV zu jedem untersuchten Zeitpunkt der PLC-abhängigen Aktivierung und der  $Mg^{2+}$ -abhängige Block, der jeweils bei etwa +50 mV am stärksten ausgeprägt ist und sich über einen größeren Spannungsbereich (-50 bis  $\gg +100$  mV) als bei TRPC5 ausdehnt. Der hier gezeigte Versuch ist repräsentativ für insgesamt 5 unabhängige Experimente.

einen Maximalwert, der jedoch wahrscheinlich keine theoretische Relevanz für ein Modell besitzt. Ab diesem Potential setzte der  $Mg^{2+}$ -abhängige Block von TRPC4 ein (Schaefer et al., 2000) und beeinflusste die Leitfähigkeit bis weit über den untersuchten Spannungsbereich hinaus. Dies führte dazu, dass auch bei TRPC4 die Werte für  $g_{max}$  nicht durch einfaches Ablesen bestimmt werden konnten. Die kontinuierlichen Anstiege in den g-V-Beziehungen zwischen -160 mV und -40 mV waren jedoch unterschiedlich steil und verdeutlichten, dass eine alleinige Verschiebung der g-V-Beziehungen zu negativeren Potentialen nicht den Zusammenhang zwischen der Spannungsabhängigkeit und der G-Protein-abhängigen Aktivierung von TRPC4 erklären kann, sondern sich wahrscheinlich auch  $g_{max}$  vergrößert. Zusammenfassend scheinen somit die Ströme durch TRPC4 eine ähnliche Spannungsabhängigkeit wie die Ströme durch TRPC5 aufzuweisen, die nicht adäquat durch ein einfaches *Two-State-Model* (Abb. 3.5A) beschrieben werden kann.

### 3.2.3.2. TRPC3 und TRPC6

TRPC3 und TRPC6 weisen eine geringere Sequenzähnlichkeit zu TRPC5 auf als TRPC4 und gehören zur Gruppe 3 der klassischen TRP-Kanäle (Clapham et al., 2001). Die Infusion von  $GTP\gamma S$  ins Cytosol von HEK293-Zellen, die entweder mit cDNA von TRPC3 oder TRPC6 transfiziert wurden, führte auch bei diesen Kanälen zu transienten Einwärtsströmen bei -60 mV. Für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit wurden in Experimenten sowohl mit TRPC3 als auch mit TRPC6 depolarisierende Spannungspulse (von -120 mV auf -80, -40, 0, +40, +80, +120, +160 bzw. +200 mV) appliziert. Wie bei TRPC5 kam es am Anfang dieser Pulse zu einer Zunahme der Ströme auf ein Gleichgewichtsniveau (Abb. 3.8A und B), was auf eine spannungsabhängige Öffnung der Kanäle hindeutet. Bei sehr geringer PLC-abhängiger Aktivität ( $n = 8$ , Abb. 3.8A, *links*) fiel TRPC3 durch eine deutlich langsamere Öffnungskinetik im Vergleich zu TRPC5 auf (vgl. Abb. 3.4A, *links*). Zu späteren Zeitpunkten war die Geschwindigkeit der Stromzunahme während depolarisierender Pulse jedoch deutlich höher (Abb. 3.8A, *Mitte*) und ähnlich den Strömen durch TRPC5. Auch bei TRPC6 ( $n = 5$ ) nahm die Geschwindigkeit der spannungsabhängigen Aktivierung (während depolarisierender Pulse) im Verlauf der PLC-abhängigen Stimulierung leicht zu (Abb. 3.8B, *links* und *Mitte*). Dies deutete auf eine Änderung der Spannungsabhängigkeiten von TRPC3 und TRPC6 während der PLC-abhängigen Aktivierung hin.

Am Ende der Spannungspulse (hyperpolarisierende Spannungssprünge von variablen Spannungen zurück auf -120 mV, Abb. 3.8A und B) kam es jeweils in allen Experimenten mit TRPC3 bzw. TRPC6 zu einem spannungsabhängigen Abfall der Ströme (Tailströme). Tailströme wie in Abbildung 3.8A und B wurden auch unter monoionischen extrazellulären Bedingungen beobachtet (entweder 150 mM  $Na^+$  oder 30 mM  $Ca^{2+}$ , jeweils  $n = 3$ , Daten nicht gezeigt) und sind daher,

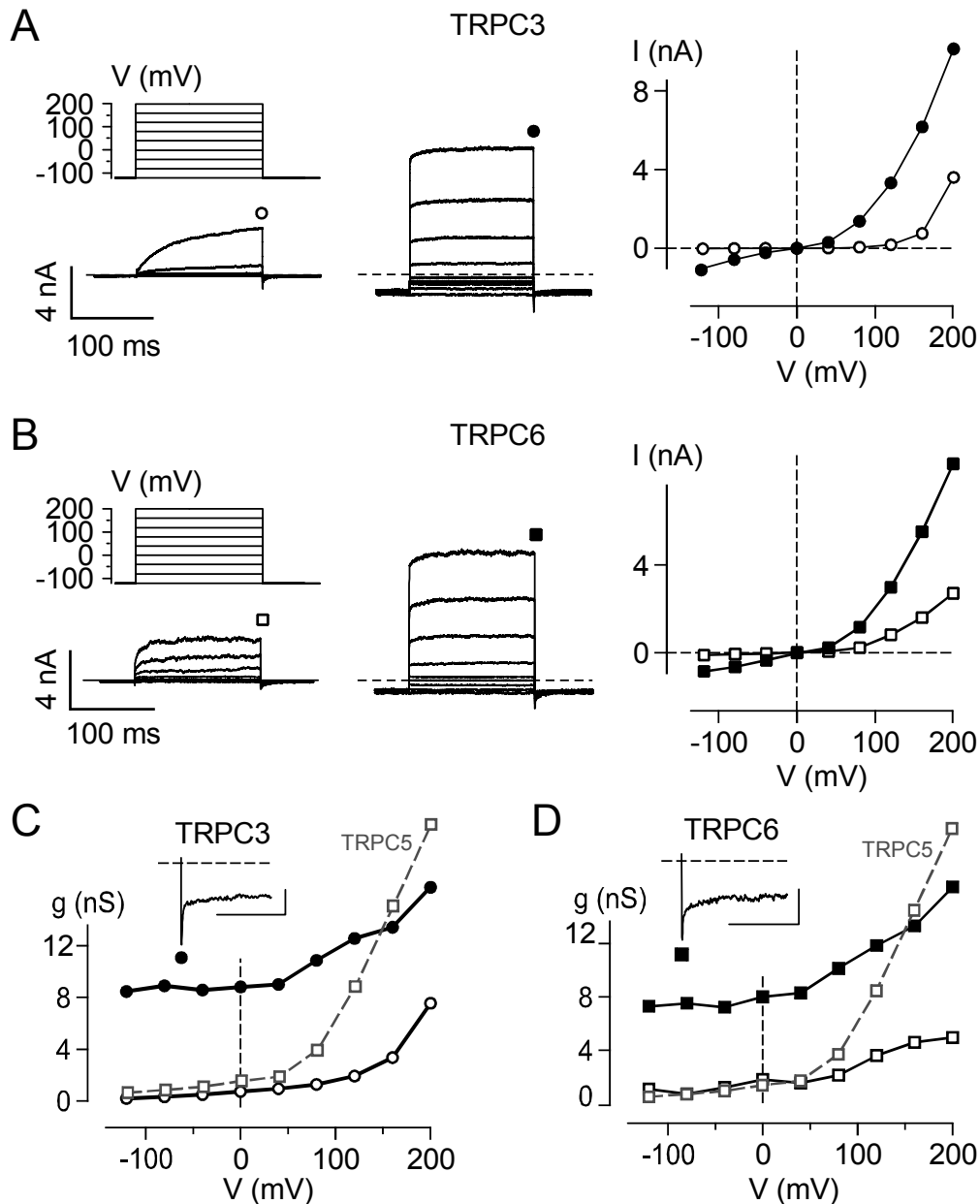


Abbildung 3.8: **Die Spannungsabhängigkeit von TRPC3 und TRPC6.** A: *Links*, Ströme durch TRPC3 während Spannungspulsen von -120 mV auf -80, -40, 0, +40, +80, +120, +160 und +200 mV an zwei verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung durch GTP $\gamma$ S-Infusion über die Patch-Pipette ins Cytosol. Die gestrichelten Linien markieren 0 nA, die Symbole ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) den rechts und in C betrachteten Spannungssprung. *Inset*, Appliziertes Spannungsprotokoll. *Rechts*, I-V-Beziehungen der Gleichgewichtskomponenten aus den links gezeigten Strömen durch TRPC3 (vor dem hyperpolarisierenden Spannungssprung) C: g-V-Beziehungen der in A abgebildeten instantanen Komponenten der Tailströme durch TRPC3 (kurz nach dem Spannungssprung). Während der Aktivierung von TRPC3 verschoben sich die g-V-Beziehungen in Richtung höherer Leitfähigkeiten; die Form blieb jedoch weitestgehend erhalten. Der graue, gestrichelte Graph zeigt die g-V-Beziehung von TRPC5 zu Beginn seiner PLC-abhängigen Aktivierung (entnommen aus Abb. 3.4C). *Inset*, Ausschnitt eines Tailstroms durch TRPC3 nach einem Spannungssprung von +200 mV auf -120 mV. Skalierung im Inset von D: 500 pA, 20 ms. Die hier gezeigten Daten sind repräsentativ für insgesamt 8 (TRPC3) bzw. 5 (TRPC6) unabhängige Experimente.

wie bei TRPC5, am ehesten durch eine spannungsabhängige Schließung der Kanäle zu erklären. Im Gegensatz zu den Strömen durch TRPC5 hatten die Tailströme durch TRPC3 bzw. TRPC6 jedoch keine langsame Komponente und insgesamt eine deutlich schnellere Kinetik (*Inset*, Abb. 3.8C und D). Zusätzlich zeigte die aus den instantanen Komponenten dieser Ströme ermittelte Leitfähigkeit im untersuchten Bereich nur eine sehr geringe Abhängigkeit von der Spannung. Zu Beginn der PLC-abhängigen Aktivierung nahm die Leitfähigkeit der Gruppe-3-TRPC-Kanäle zwischen -120 mV und +200 mV um weniger als 10 nS zu (Abb. 3.8C und D: ○ bzw. □). Die g-V-Beziehungen von TRPC5 wiesen zu ähnlichen Zeitpunkten einen deutlich größeren Anstieg auf (Abb. 3.8 C und D, grauer Graph). Mit zunehmender PLC-abhängiger Aktivität stiegen die Leitfähigkeiten von TRPC3 und TRPC6 bei allen untersuchten Potentialen an, und die Form der g-V-Beziehungen änderte sich kaum (Abb. 3.8C und D: ● bzw. ■). Ob es sich hierbei exklusiv um eine Verschiebung entlang der g-Achse, und damit um eine spannungsunabhängige Zunahme der Leitfähigkeit, handelte, war jedoch schwer zu determinieren. Falls zusätzlich auch eine Verschiebung der g-V-Beziehungen zu negativeren Potentialen zuträfe, würde dies zumindest die PLC-abhängige Änderung der spannungsabhängigen Öffnungskinetiken von TRPC3 und TRPC6 (Abb. 3.8A und B) erklären.

### 3.3. Potenzierung von TRPC5 durch Protonen

#### 3.3.1. Sequenzvergleich der Porenregion verschiedener TRP-Kanäle

Ein Sequenzvergleich der Region zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne (TM5 und TM6) zeigt, dass TRPC5 und TRPV1 jeweils drei Glutamatreste an ähnlichen Positionen besitzen (Abb. 3.9). Einer der Glutamatreste ist nahe TM5 lokalisiert, die anderen zwei liegen in einem EFTE-Motiv, das sich nahe TM6 befindet. Zwei dieser drei Reste besitzen dabei funktionelle Relevanz für die Potenzierung der Ströme durch TRPV1 (E600, E648) bzw. TRPC5 (E543, E595) durch extrazelluläre Lanthanoide (Jung *et al.*, 2003, Tousova *et al.*, 2005). Ein proximaler Glutamatrest (E545) und das EFTE-Motiv (Reste 594-597) sind an ähnlichen Stellen auch in der Primärsequenz von TRPC4 zu finden, was zu den potenzierenden Effekten von extrazellulärem  $\text{La}^{3+}$  auf die Ströme durch diesen Kanal passt (Schaefer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu besitzt TRPC6, das durch  $\text{La}^{3+}$  oder  $\text{Gd}^{3+}$  nur inhibiert wird, an den entsprechenden Stellen neutrale (I660) bzw. sogar positiv geladene Aminosäuren (K697). In TRPV1 spielen die Glutamatreste E600 und E648 außerdem eine Rolle bei der Aktivierung und Potenzierung seiner Ströme durch extrazelluläre Protonen ( $\text{H}^+$ , Jordt *et al.*, 2000). Die Präsenz

funktionell relevanter Glutamatreste an den genannten Positionen in TRPV1 und den Gruppe 4-TRPC-Kanälen gab daher Anlass zu der Frage, ob und wie die Ströme durch TRPC4 und TRPC5 bei einer Änderung des extrazellulären pH-Werts moduliert werden.

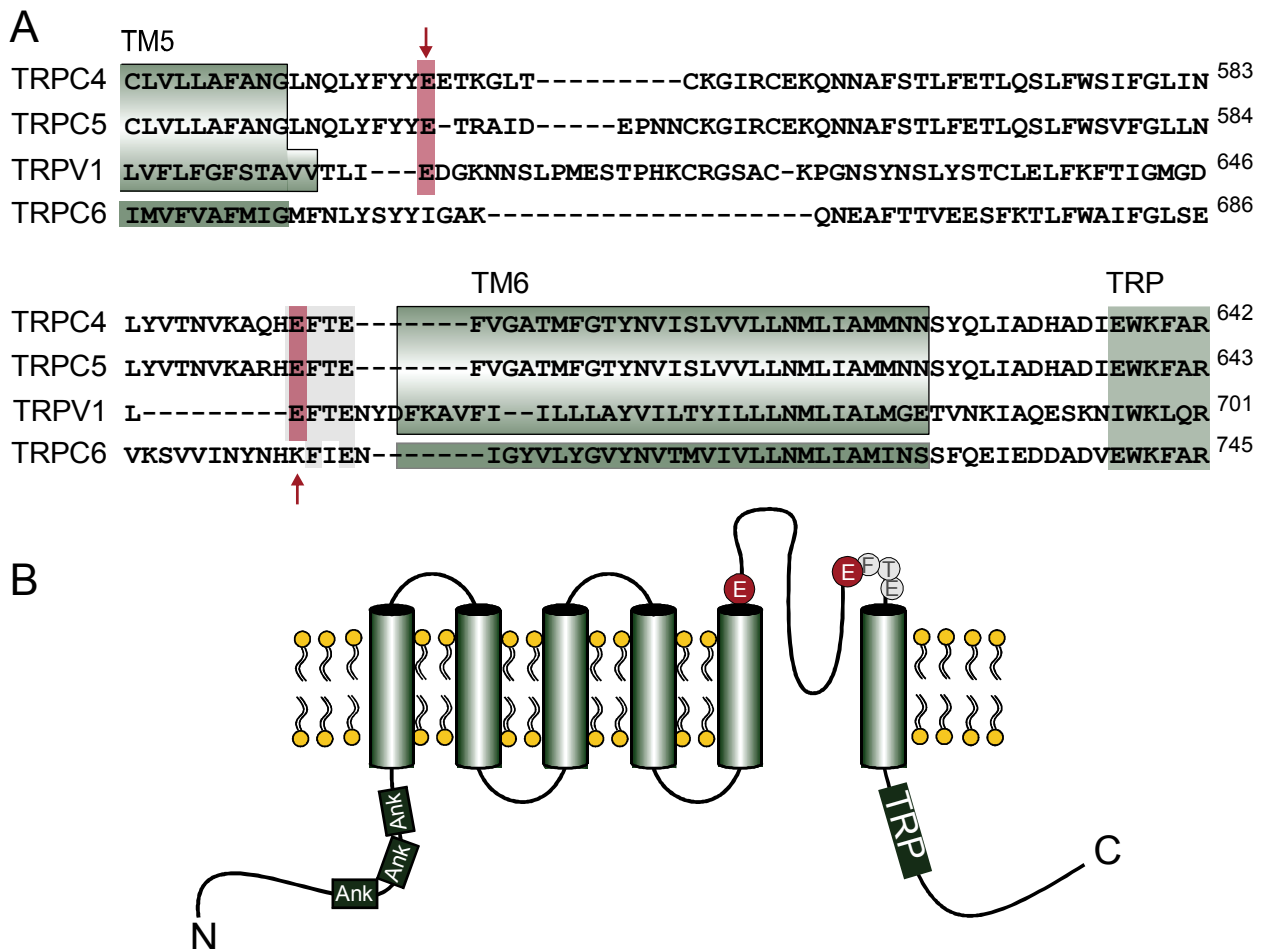


Abbildung 3.9: **Die Porenregion von TRPC5.** A: Sequenzvergleich der mutmaßlichen Porenregionen von TRPC4, TRPC5, TRPV1 und TRPC6. Die grün hinterlegten Bereiche markieren die Transmembrandomänen TM5 und TM6 sowie die TRP-Box (TRP). Die roten Pfeile markieren die Positionen (rot hinterlegt) der beiden Glutamatreste (TRPC5: E543 und E595, TRPV1: E600 und E648), die an der Potenzierung von TRPC5 und TRPV1 durch Lanthanoide beteiligt sind, und die in TRPC4, jedoch nicht in TRPC6 vorkommen. Das EFTE-Motiv nahe TM6 ist durch eine graue Box gekennzeichnet. B: Membrantopologie von TRPC5. Eingezeichnet sind die Positionen von E543 und E595 (rot), dem ersten Glutamatrest im EFTE-Motiv (grau). Ank = Ankyrin-ähnliche Domäne, TRP = TRP-Box, N und C = Termini der Kanaluntereinheit.

### 3.3.2. Extrazelluläre H<sup>+</sup> potenzieren Ganzzell-Ströme durch TRPC5

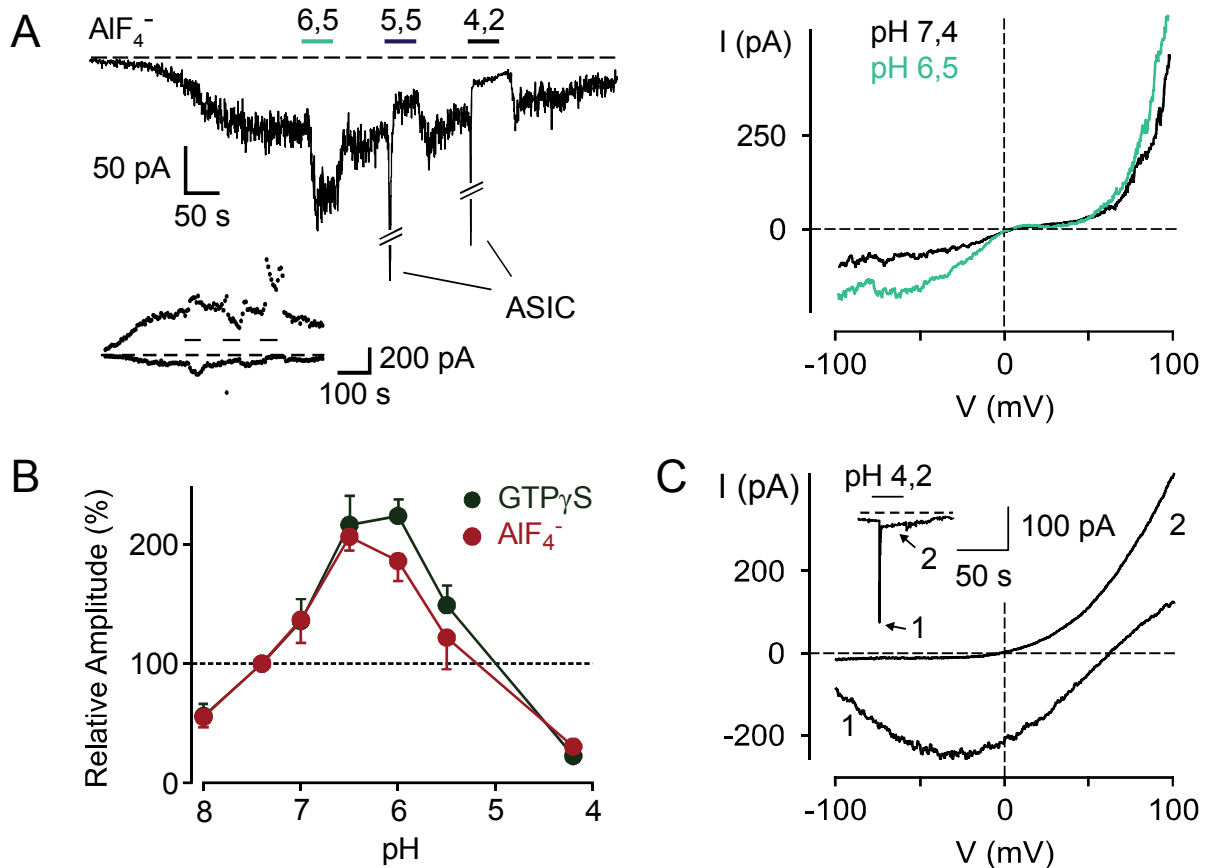
#### 3.3.2.1. PLC-abhängig aktivierte Ströme durch TRPC5

Es wurden Patch-Clamp-Experimente im *Whole-Cell*-Modus durchgeführt, um zu testen, ob PLC-abhängig aktivierte Ströme durch TRPC5 durch Änderungen des extrazellulären pH-Werts moduliert werden können. Die Infusion von GTP $\gamma$ S oder AIF $_4^-$  ins Cytosol von HEK293-Zellen, die TRPC5 transient exprimierten, führte, wie

in Kapitel 3.1.1 beschrieben, zu Einwärtsströmen bei negativen Haltepotentialen. Infolge einer Reduktion des extrazellulären pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 6,5 kam es jeweils zu einer starken Potenzierung dieser Ströme. Wie in Abbildung 3.10A exemplarisch gezeigt, war der Effekt reversibel und geschah einige Sekunden nach dem Lösungswechsel. Interessanterweise war die Potenzierung der TRPC5-Ströme jedoch bei negativen Membranpotentialen stärker ausgeprägt als bei positiven. Die mit  $\text{AlF}_4^-$  aktivierten Ströme vergrößerten sich durch den pH-Wechsel von 7,4 auf 6,5 bei -50 mV um  $107 \pm 12\%$ , und bei +100 mV nur um  $17 \pm 3\%$  ( $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Die Möglichkeit, dass die  $\text{H}^+$  selbst durch TRPC5 fließen und dadurch den Stromzuwachs hervorrufen, ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da der Unterschied in den  $\text{H}^+$ -Konzentrationen ( $[\text{H}^+]$ ) bei pH 7,4 und pH 6,5 lediglich  $0,276 \mu\text{M}$  beträgt. Außerdem blieb das Umkehrpotential von TRPC5 bei allen untersuchten pH-Werten unverändert. In weiteren Experimenten wurden verschiedene pH-Werte zwischen 8,0 und 4,2 getestet, um die Konzentrationsabhängigkeit der Potenzierung von TRPC5-Strömen durch extrazelluläre  $\text{H}^+$  zu untersuchen (Abb. 3.10B). Reduktionen des extrazellulären pH-Wertes von 7,4 auf 7,0 und 6,0 führten zu Potenzierungen, die (wie bei pH 6,5) bei negativen Membranpotentialen stärker ausgeprägt waren. Die größten Effekte traten bei pH 6,5 und pH 6,0 auf. Bei noch größeren  $[\text{H}^+]$  wurde die Potenzierung kleiner (pH 5,5) und bei pH 4,2 kam es in allen Experimenten zu einer Inhibition der TRPC5-Ströme. Eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes auf pH 8,0 hingegen verkleinerte sowohl die Einwärts- ( $56 \pm 10\%$ , -60 mV) als auch die Auswärtsströme ( $77 \pm 5\%$ , -100 mV) durch TRPC5 signifikant (jeweils  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ).

Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Senkung des extrazellulären pH-Werts zwei Arten von endogenen Strömen sowohl in Messungen an transfizierten als auch an untransfizierten HEK293-Zellen hervorrief. Eine Änderung des extrazellulären pH von 7,4 auf 6,5 oder noch niedrigere Werte wurde begleitet von sehr kurzzeitig präsenten Einwärtsströmen mit einer Amplitude zwischen -0,2 und -1 nA beim Haltepotential (bei pH 5,5 und -50 mV in untransfizierten HEK293-Zellen:  $-14,0 \pm 3,7 \text{ pA/pF}$  und  $2,2 \pm 0,4 \text{ s}$ ,  $n = 5/5$ , Abb. 3.10C, I-V 1). Mit ihrer pH-Abhängigkeit, Kinetik und dem positiven Umkehrpotential bei etwa +60 mV wiesen diese Ströme alle Charakteristika von *Acid Sensing Ion Channels* (ASIC) auf, welche endogen in HEK293-Zellen exprimiert werden (Gunthorpe *et al.*, 2001). Zusätzliche Kontrollexperimente zeigten außerdem, dass diese Ströme durch die Applikation von  $30 \mu\text{M}$  Amilorid inhibiert werden konnten ( $n = 5$ , Daten nicht gezeigt). Wegen ihrer schnellen Aktivierung und Inaktivierung überlagerten diese Ströme jedoch, wenn überhaupt, nur mit der Anfangsphase der untersuchten TRPC5-Potenzierung und wurden daher nicht routinemäßig geblockt. Der zweite Typ von endogenen Strömen war stark auswärts rektifizierend und hatte ein Umkehrpotential nahe 0 mV (Abb. 3.10C, I-V 2). Solche Ströme traten nur bei sehr

niedrigen pH-Werten auf (bei pH 4,2:  $n = 4/5$  in untransfizierten HEK293-Zellen), und waren während der gesamten Dauer der pH-Reduktion präsent. Vieles deutet auf TRPM7 als Kanal hin, welcher diese Ströme leitet. TRPM7 wird sowohl endogen in HEK293-Zellen exprimiert und ist außerdem durch sehr niedrige pH-Werte aktivierbar (Li *et al.*, 2007). Auch diese Ströme wurden jedoch nicht standardmäßig geblockt, da sie, wenn überhaupt, nur bei pH 4,2 auftraten. Außerdem führten ihre recht kleinen Einwärtskomponenten (bei -50 oder -60 mV) lediglich zu einem geringen Fehler der TRPC5-Amplituden, welche im Zeitverlauf



**Abbildung 3.10: Potenzierung und Inhibition von PLC-vermittelten Strömen durch TRPC5.** A:  $\text{AlF}_4^-$  - induzierte Ganzzellströme durch TRPC5 wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH moduliert. Links, Zeitverlauf bei -50 mV und  $\pm 100$  mV (Inset). Beim Wechsel von pH 7,4 auf pH 6,5 wurden die Ströme potenziert, bei kleineren pH-Werten inhibiert. Die gestrichelten Linien zeigen 0 pA an. ASIC = Ströme durch den endogenen Acid Sensing Ion Channel, die hier gekürzt wurden. Rechts, I-V-Beziehungen von TRPC5, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). Die potenzierenden Effekte von  $\text{H}^+$  waren bei negativen Potentialen stärker ausgeprägt als bei positiven. B: pH-Abhängigkeit der  $\text{AlF}_4^-$  (-50 mV, rot) und  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -induzierten Ströme (-60 mV, dunkelgrün) durch TRPC5 relativ zum Strom bei pH 7,4 (100%). C: Endogene Ströme in HEK293-Zellen, die durch Senkung des extrazellulären pH-Werts aktiviert wurden. Ihre Charakteristika lassen darauf schließen, dass es sich hierbei um ASICs (Acid Sensing Ion Channels, I-V 1) sowie TRPM7 (I-V 2) handeln könnte (siehe Text). Inset, Zeitverlauf der Kontrollmessung bei -50 mV, aus der die I-V-Beziehungen stammen. Die Dauer der Applikation von pH 4,2 ist durch den Balken markiert. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die gezeigten I-V-Beziehungen aufgezeichnet wurden.



beim Haltepotential abgelesen wurden. Letztendlich ist davon auszugehen, dass die Inhibition der Ströme durch TRPC5 bei pH 4,2 in allen gezeigten pH-Wirkungskurven aufgrund der Präsenz dieses TRPM7-ähnlichen Stroms minimal unterschätzt wurde.

### 3.3.2.2. Basale Ströme durch TRPC5

Basale Ströme sind charakteristisch für TRPC5 und unterscheiden sich im *Whole-Cell*-Modus signifikant vom Leckstrom oder sonstigen Komponenten (siehe Kap. 3.1.1). Wie Abbildung 3.11 zeigt, wurden auch diese Ströme durch Änderungen des extrazellulären pH-Werts moduliert. Bei pH 8,0 war TRPC5 immer noch spontan aktiv, jedoch geringer als bei pH 7,4 (Abb. 3.11A). Reduktionen des extrazellulären pH-Werts führten jeweils zu größeren Einwärtsströmen beim Halte-

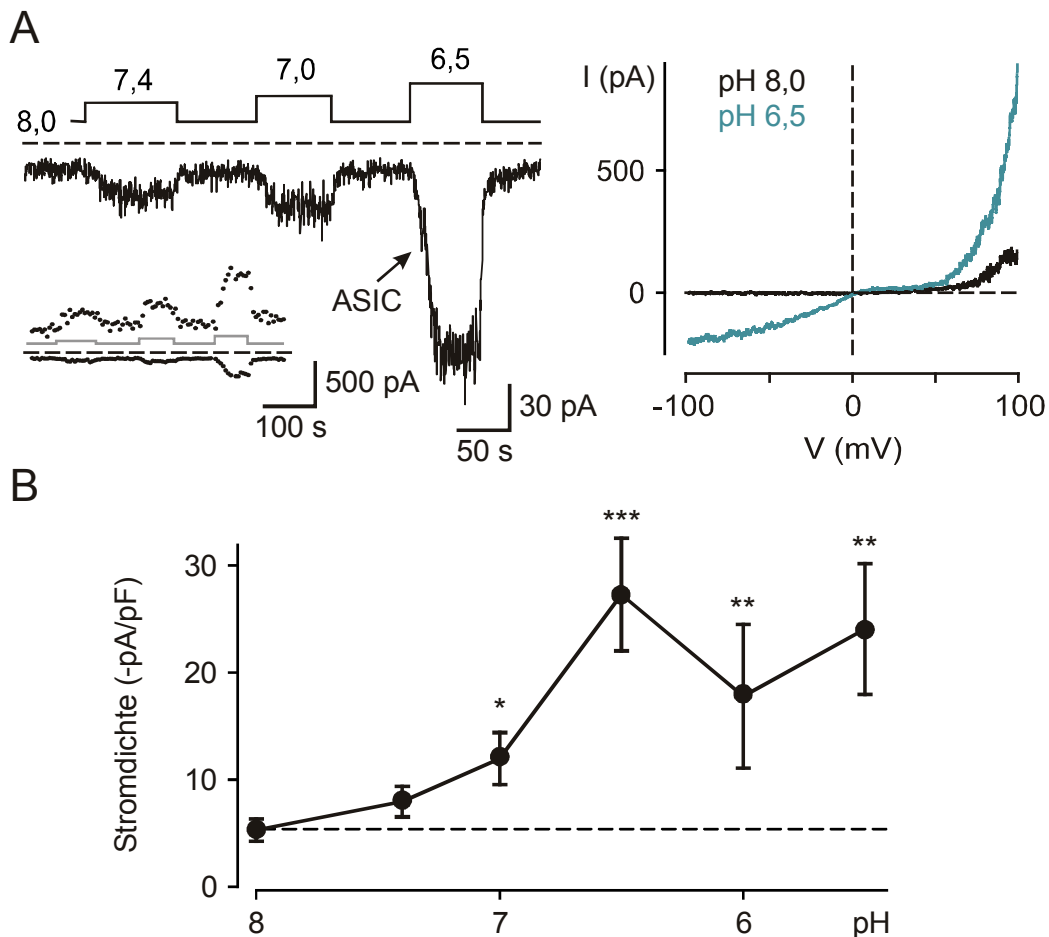


Abbildung 3.11: **Potenzierung der basalen Ströme durch TRPC5.** A: Basale Ganzzellströme durch TRPC5 wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts potenziert. *Links*, Zeitverlauf bei -50 mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Beim Wechsel von pH 8,0 auf niedrigere pH-Werte wurden die Ströme konzentrationsabhängig verstärkt. Die gestrichelten Linien zeigen 0 pA an. ASIC = Ströme durch den endogenen *Acid Sensing Ion Channel*. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC5, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). B: pH-Abhängigkeit der basalen Ströme durch TRPC5 (-50 mV), angegeben als Stromdichte. Alle Werte wurden auf Änderungen gegenüber pH 8,0 (100 %, gestrichelte Linie) getestet.

potential (-50 mV), welche bei pH 6,5 die größte Amplitude hatten (Abb. 3.11B). Aufgrund ihrer charakteristischen I-V-Beziehung konnten diese Ströme TRPC5 zugeordnet werden. Bei pH 6,0 und pH 5,5 waren die Ströme minimal, aber nicht signifikant kleiner als bei pH 6,5. Im Vergleich zu den G-Protein-aktivierten Strömen durch TRPC5 fiel die Potenzierung seiner basalen Ströme deutlich stärker aus. Die durch Infusion von  $\text{AlF}_4^-$  aktivierten TRPC5-Ströme wurden durch die Reduktion des pH-Werts von 7,4 auf 6,5 in etwa verdoppelt ( $207 \pm 12\%$ , -50 mV,  $n = 9$ , siehe Kap. 3.3.2.1). Das Verhältnis der basalen Ströme bei pH 6,5 und pH 7,4 war hingegen mit  $549 \pm 57\%$  signifikant größer (-50 mV,  $p < 0,001$ ,  $n = 13$ ). Auch bei anderen Potentialen wurden die basalen Ströme durch TRPC5 im Vergleich zu den PLC-abhängig aktivierten stärker potenziert. So nahmen die mit Hilfe von  $\text{AlF}_4^-$  aktivierten Ströme bei +100 mV kaum zu, wenn der pH-Wert von pH 7,4 auf pH 6,5 gesenkt wurde ( $117 \pm 3\%$ ,  $n = 9$ , siehe Kap. 3.3.2.1). Die Amplituden der basalen Ströme waren bei pH 6,5 hingegen mehr als doppelt so groß wie bei pH 7,4 ( $242 \pm 27\%$ , +100 mV,  $n = 13$ ,  $p < 0,001$  vgl.  $\text{AlF}_4^-$ -aktivierte Ströme bei +100 mV).

### 3.3.3. Einzelkanaluntersuchung der $\text{H}^+$ -Potenzierung von TRPC5-wt

Die oben beschriebenen Effekte extrazellulärer  $\text{H}^+$  auf Ströme durch TRPC5 wiesen große Ähnlichkeiten zu denen von  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  auf (z.B. Konzentrationsabhängigkeit, biphasischer Charakter mit Potenzierung und Block, größere Ausprägung bei negativen Haltepotentialen). Es wurden Einzelkanalmessungen im *Outside-Out*-Modus durchgeführt, um die Auswirkungen des extrazellulären pH-Wertes auf die basalen TRPC5-Ströme näher zu untersuchen und mit denen von  $\text{Gd}^{3+}$  zu vergleichen. Bei pH 7,4 und -60 mV war TRPC5 spontan aktiv und hatte eine durchschnittliche Einzelkanalamplitude von  $-2,46 \pm 0,16$  pA ( $41,0 \pm 2,6$  pS,  $n = 7$ ). Eine Ansäuerung des extrazellulären Milieus (pH 6,5) hatte drastische Auswirkungen auf die Einzelkanal-Charakteristika von TRPC5 (Abb. 3.12A): Die Einzelkanalamplitude verringerte sich auf durchschnittlich  $-1,63 \pm 0,14$  pA ( $27,2 \pm 2,3$  pS,  $n = 7$ ,  $p < 0,01$  vgl. pH 7,4), und die Offenwahrscheinlichkeit nahm von  $0,03 \pm 0,01$  (pH 7,4,  $n = 5$ ) auf  $0,69 \pm 0,18$  (pH 6,5,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ) signifikant zu. Dass es sich bei den Strömen bei pH 6,5 tatsächlich um TRPC5 handelte, zeigten mit Hilfe von Spannungsrampen gewonnene i-V-Beziehungen (Abb. 3.12B), die wie bei pH 7,4 (siehe Kap. 3.1.2) doppelt-rektifizierend waren und nahe 0 mV umkehrten. Da die Einzelkanalamplitude von TRPC5 reduziert war, muss die im *Whole-Cell*-Modus beobachtete Potenzierung der Ströme bei pH 6,5 aus der Erhöhung der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit (Abb. 3.12A) resultieren. Interessanter Weise waren die Einzelkanal-Charakteristika von TRPC5 bei pH 6,5 sehr ähnlich zu denen, die in Anwesenheit von mikromolaren Konzentrationen an  $\text{Gd}^{3+}$  beobachtet werden konnten (Abb. 3.12C). Auch hier wurde in Übereinstimmung mit

früheren Arbeiten (Jung *et al.*, 2003) die Einzelkanalamplitude von TRPC5 deutlich reduziert, begleitet von einer deutlichen Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von  $0,03 \pm 0,01$  (pH 7,4,  $n = 5$ ) auf  $0,49 \pm 0,11$  (pH 7,4 + 100  $\mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$ ,  $n = 3$ ,  $p < 0,01$ ).

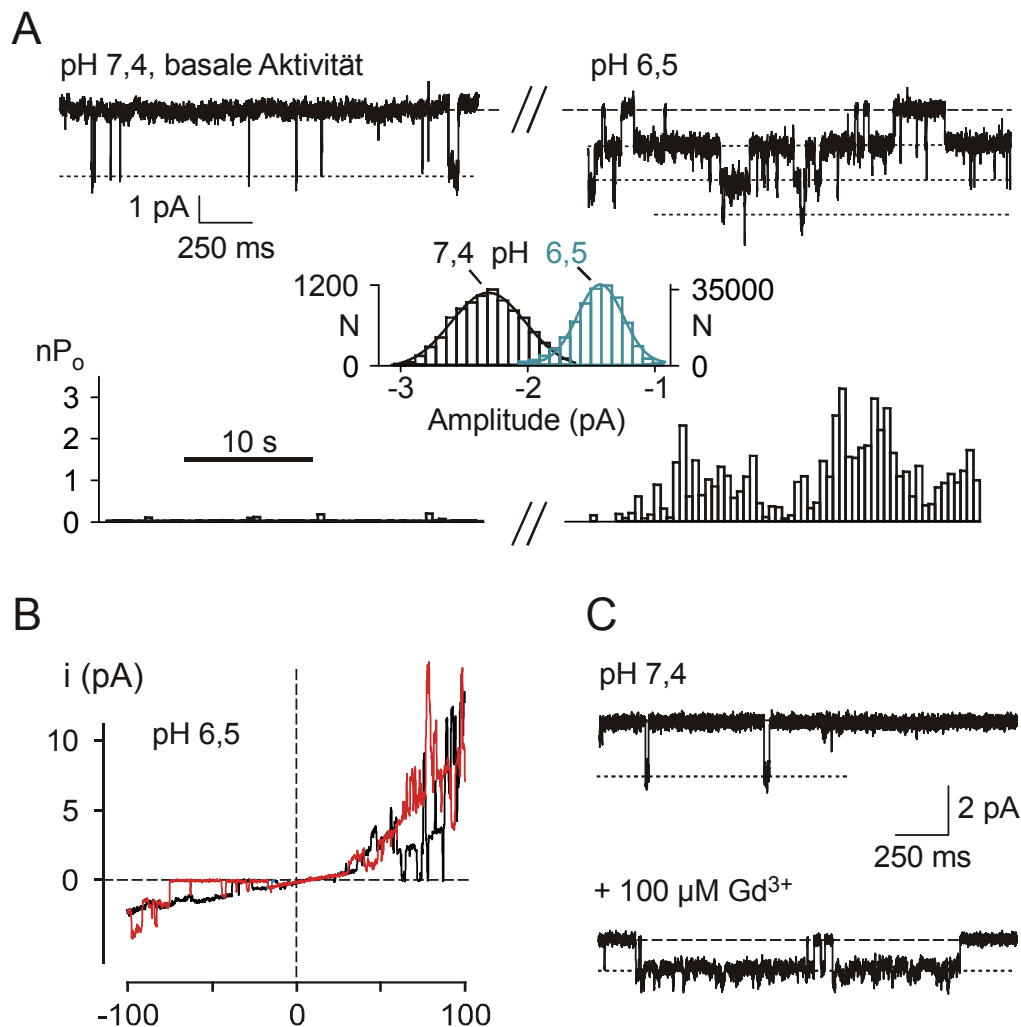


Abbildung 3.12: **Effekte von  $\text{H}^+$  auf basal aktive TRPC5-Einzelkanäle.** A:  $\text{H}^+$  erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit und reduzierten die Einzelkanalamplitude der spontanen Einzelkanalströme durch TRPC5. *Oben*, Repräsentative Ausschnitte aus einer Einzelkanalmessung im *Outside-Out*-Modus ( $-60$  mV) bei pH 7,4 (links) und pH 6,5 (rechts). Die gestrichelten Linien markieren den geschlossenen Zustand, die gepunkteten Linien die offenen Zustände. *Unten*, Aktivität von TRPC5 über längere Zeitabschnitte desselben Experiments, ausgedrückt als Offenwahrscheinlichkeit ( $n\text{P}_o$ ) gegenüber der Zeit. *Inset*, *All-Points*-Histogramme, die aus den Spuren bei pH 6,5 (blau) und pH 7,4 (schwarz) gewonnen wurden. B: Ströme zwischen  $-100$  und  $+100$  mV bei pH 6,5 während einer Einzelkanalmessung an HEK293-Zellen, die mit TRPC5-cDNA transfiziert wurden. Die I-V-Beziehungen wurden mit Spannungsrampen gewonnen und zeigen einen für TRPC5 charakteristischen, doppelt-rektifizierenden Verlauf. Zur besseren Unterscheidung wurde eine der beiden Kurven rot gefärbt. C:  $\text{Gd}^{3+}$  erhöhte ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit und reduzierte die Einzelkanalströme durch TRPC5. Gezeigt sind Ausschnitte aus *Outside-Out*-Messungen unter Kontrollbedingungen (pH 7,4, oben) und während der Applikation von  $100 \mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  (unten) bei  $-60$  mV. Die gestrichelten Linien markieren den geschlossenen Zustand, die gepunkteten den offenen.

### 3.3.4. Molekulare Komponenten der Effekte von $H^+$ auf TRPC5

#### 3.3.4.1. Potenzierung der PLC-abhängig aktivierten Ströme

Die auffälligen Gemeinsamkeiten der Potenzierung von TRPC5-Strömen durch extrazelluläres  $Gd^{3+}$  und extrazelluläre  $H^+$  ließen vermuten, dass die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen beider Effekte ähnlich sind. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Glutamatreste E543 und E595, die Determinanten der Potenzierung von TRPC5 durch Lanthanoide (Jung *et al.*, 2003), auch die Potenzierung von TRPC5 durch  $H^+$  beeinflussen. Die Punktmutanten TRPC5-E543Q und TRPC5-E595Q konnten in HEK293-Zellen funktionell exprimiert werden, d.h., die Infusion von  $GTP\gamma S$  ins Cytosol von HEK293-Zellen, die mit einer dieser Mutanten transfiziert wurden, lieferte jeweils

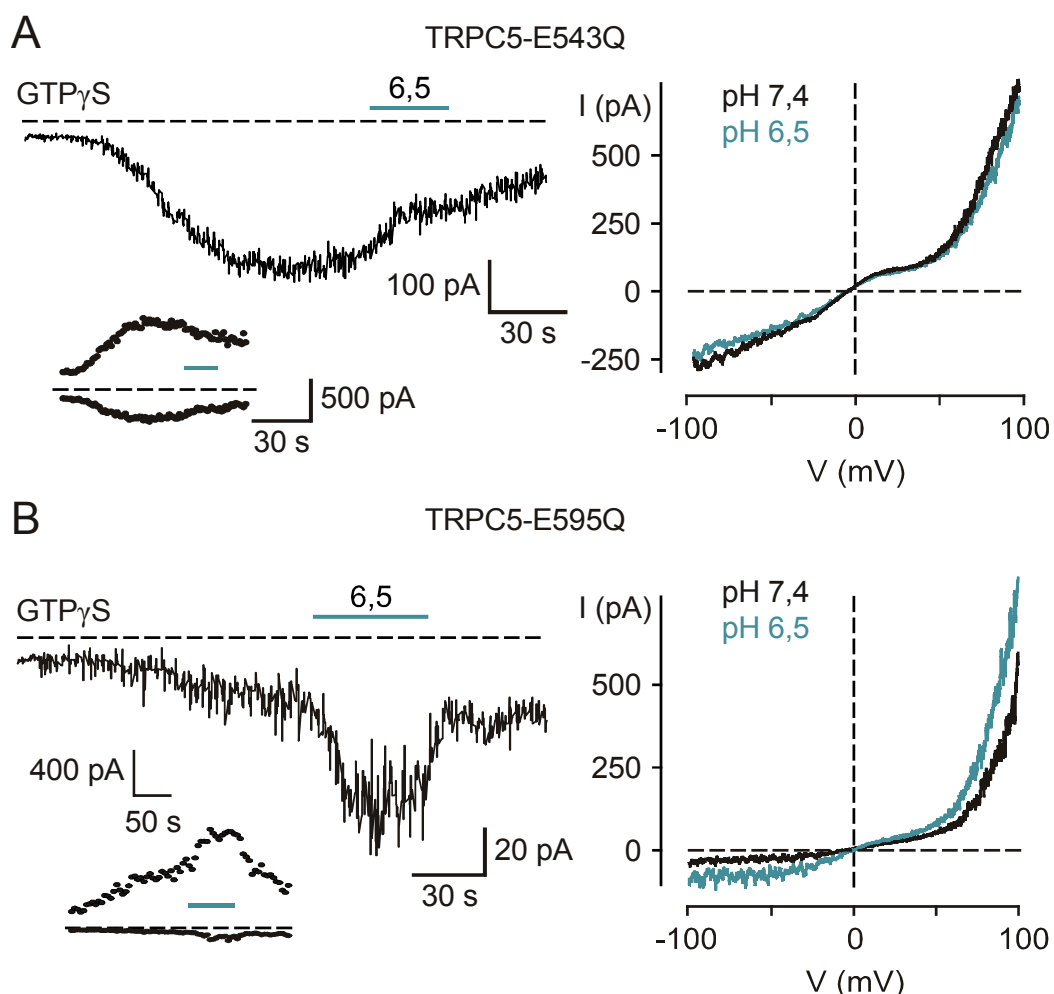


Abbildung 3.13: **Effekte von  $H^+$  auf  $GTP\gamma S$ -aktivierte Ströme durch die TRPC5-Punktmutanten E543Q und E595Q.** A: *Links*,  $GTP\gamma S$  - induzierte Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts auf pH 6,5 inhibiert. *Links*, Zeitverlauf bei -60 mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien sind die Nulllinien. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC5-E543Q, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). B: Gleiches Experiment wie in A, nur mit TRPC5-E595Q. Die  $GTP\gamma S$ -aktivierte Ströme durch diese Mutante wurden ähnlich stark wie beim Wildtyp durch die Reduktion des extrazellulären pH-Werts auf pH 6,5 potenziert.

transiente Einwärtsströme beim Haltepotential (-60 mV, Abb. 3.13A und B). Die I-V-Beziehungen von E543Q und E595Q hatten ähnliche Charakteristika wie die von TRPC5wt. Im Unterschied zum Wildtyp ( $-50,6 \pm 6,9$  pA/pF,  $n = 8$ ) waren die Stromdichten in Experimenten mit TRPC5-E543Q jedoch signifikant größer ( $-110,7 \pm 21,8$  pA/pF,  $n = 7$ , -60 mV,  $p < 0,05$  vgl. TRPC5-wt) und in denen mit TRPC5-E595Q ( $-22,1 \pm 6,8$  pA/pF,  $n = 21$ , -60 mV,  $p < 0,05$  vgl. TRPC5-wt, Abb. 3.14B, Inset) signifikant kleiner.

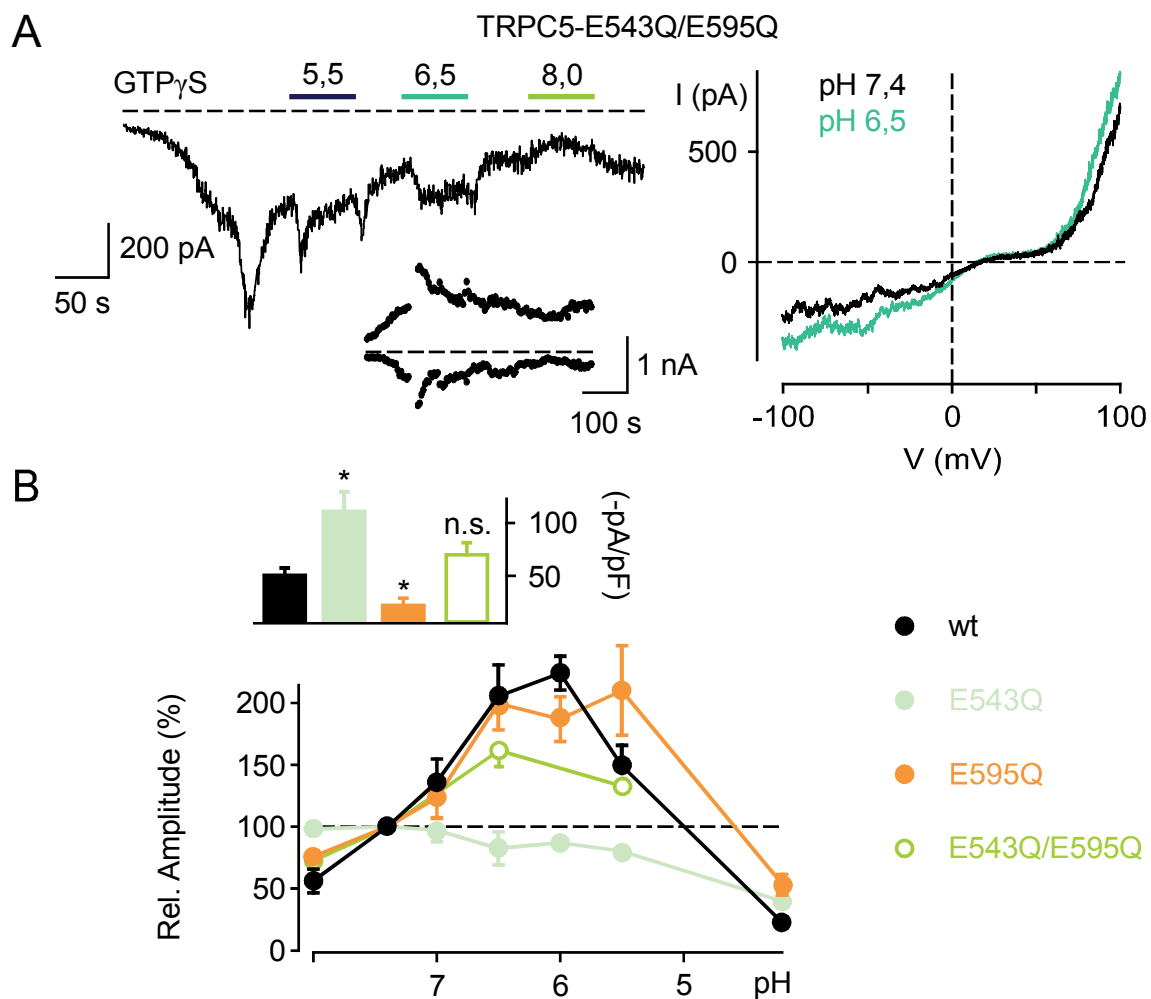


Abbildung 3.14: **Potenzierung der GTP $\gamma$ S-aktivierten Ströme von TRPC5-E543Q/E595Q durch H $^+$ .** A: *Links*, GTP $\gamma$ S - induzierte Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q/E595Q wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts von pH 7,4 auf pH 6,5 und pH 5,5 potenziert, und bei Erhöhungen auf pH 8,0 inhibiert. *Links*, Zeitverlauf bei -60 mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien sind die Nulllinien. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC5-E543Q/E595Q, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). B: pH-Abhängigkeit der Potenzierung der GTP $\gamma$ S - aktivierten Ströme durch TRPC5 und die Mutanten E543Q, E595Q sowie E543Q/E595Q (pH 7,4 = 100%). TRPC5-E543Q (hellblau) wurde nach pH-Reduktionen nur inhibiert, während die Mutanten E595Q (orange) und E543Q/E595Q (hellgrün) ähnlich dem Wildtyp (schwarz) bei moderaten pH-Senkungen potenziert und erst bei pH 4,2 blockiert wurden. *Inset*, Zusammenfassung der maximal gemessenen Stromdichten nach Aktivierung mit GTP $\gamma$ S in Experimenten mit TRPC5 und TRPC5-Mutanten. Bei TRPC5-E543Q (hellblau) waren diese signifikant höher als beim Wildtyp (wt, schwarz), bei TRPC5-E595Q (orange) signifikant niedriger.

Anders als TRPC5-wt konnten die PLC-abhängig aktivierten Ströme durch TRPC5-E543Q nicht durch eine Reduktion des extrazellulären pH-Wertes potenziert werden. Stattdessen verringerten sie sich bei pH 6,5 auf  $83 \pm 7\%$  ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Strömen bei pH 7,4. Auch bei anderen pH-Werten ( $< \text{pH } 7,4$ ) wurde TRPC5-E543Q nur blockiert, wie in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.14B zusammengefasst ist. Die halbmaximale Inhibition, ermittelt mit Hilfe der Hill-Funktion (siehe Kap. 2.4.5.1.), lag bei pH 4,5. Die TRPC5-Mutante E595Q hingegen zeigte im Vergleich zu TRPC5-wt keine Unterschiede im Verhalten nach extrazellulärer Applikation von  $\text{H}^+$ . Die Ströme durch diese Mutante vergrößerten sich signifikant, wenn der pH auf Werte zwischen pH 7,0 und pH 5,5 reduziert wurde. Die größte Potenzierung in diesen Versuchen fand bei pH 6,5 statt ( $199 \pm 21\%$ ,  $n = 7$ ,  $p < 0,001$  vgl. mit Strömen bei pH 7,4). Bei pH 4,2 wurde TRPC5-E595Q, wie der Wildtyp, fast vollständig blockiert. In Folgeexperimenten wurde die Doppelmutante TRPC5-E543Q/E595Q, in der beide zuvor untersuchten Glutamatreste neutralisiert wurden, getestet. Interessanter Weise führte eine Reduktion des extrazellulären pH von 7,4 auf 6,5 bzw. 5,5 zu einer Potenzierung der durch  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Infusion ausgelösten Ströme durch diese TRPC5-Mutante (Abb. 3.14A). Bei einem extrazellulären pH-Wert von pH 6,5 wurden die Einwärtsströme (-60 mV) auf durchschnittlich  $162,5 \pm 13,3\%$  ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$  vgl. mit pH 7,4) vergrößert. Die Mutation E595Q stellte demnach die in TRPC5-E543Q fehlende Potenzierung der Ströme durch  $\text{H}^+$  wieder her. Im Gegensatz dazu wurden die Ströme durch TRPC5-E543Q/E595Q durch die Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Gd}^{3+}$  in Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 5 mM nur blockiert ( $\text{IC}_{50} = 32,7 \pm 8,0 \mu\text{M}$ , Daten nicht gezeigt).

Da weitere Stellen (Aminosäuren) im Kanal für die Bindung von  $\text{H}^+$  und damit für die Potenzierung der Ströme verantwortlich sein könnten, wurden in den folgenden Versuchen alle anderen negativ geladenen Aminosäuren zwischen TM5 und TM6 untersucht. Die Daten sind in Abbildung 3.15 zusammengefasst. Jede der Punktmutanten TRPC5-D548N, -E549Q, -E559Q oder -E570Q zeigte ähnliche Charakteristika wie TRPC5-wt und wurde durch die Infusion von  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ins Cytosol in ähnlichem Ausmaß aktiviert. Auch die Erhöhung der extrazellulären  $[\text{H}^+]$  (pH 6,5) brachte keine Unterschiede zum Wildtyp zutage, was darauf hindeutet, dass die oben genannten Aminosäuren (D548, E549, E559 und E570) keine tragende Rolle bei der  $\text{H}^+$ -abhängigen Potenzierung der PLC-abhängig aktivierten Ströme durch TRPC5 zu spielen scheinen. Auch die Neutralisierung von E598, des zweiten Glutamatrests im nahe TM6 gelegenen EFTE-Motiv, veränderte nicht die Antwort der  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktivierten Ströme durch TRPC5 auf Senkungen des pH-Wertes. Bei pH 6,5 wurde die Punktmutante TRPC5-E598Q auf  $251 \pm 30\%$  ( $n = 4$ ,  $p = 0,45$  vgl. mit TRPC5-wt, Abb. 3.15E) potenziert. Eine Untersuchung der Doppelmutante TRPC5-E595Q/E598Q ergab ebenfalls Potenzierungen der Einwärtsströme beim

Wechsel des extrazellulären pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 6,5 ( $252 \pm 35\%$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0,27$  vgl. TRPC5-wt, Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wurde also lediglich durch die Einzelmutation des Glutamatrests E543 die  $H^+$ -abhängige Potenzierung von TRPC5 verhindert. Der Effekt wurde jedoch mit der Einführung einer zweiten Mutation (E595Q) wiederhergestellt, was zeigt, dass die Neutralisation von E543 nicht der einzige Schritt zwischen der erhöhten extrazellulären  $[H^+]$  und der Potenzierung der Ströme durch TRPC5 sein kann.

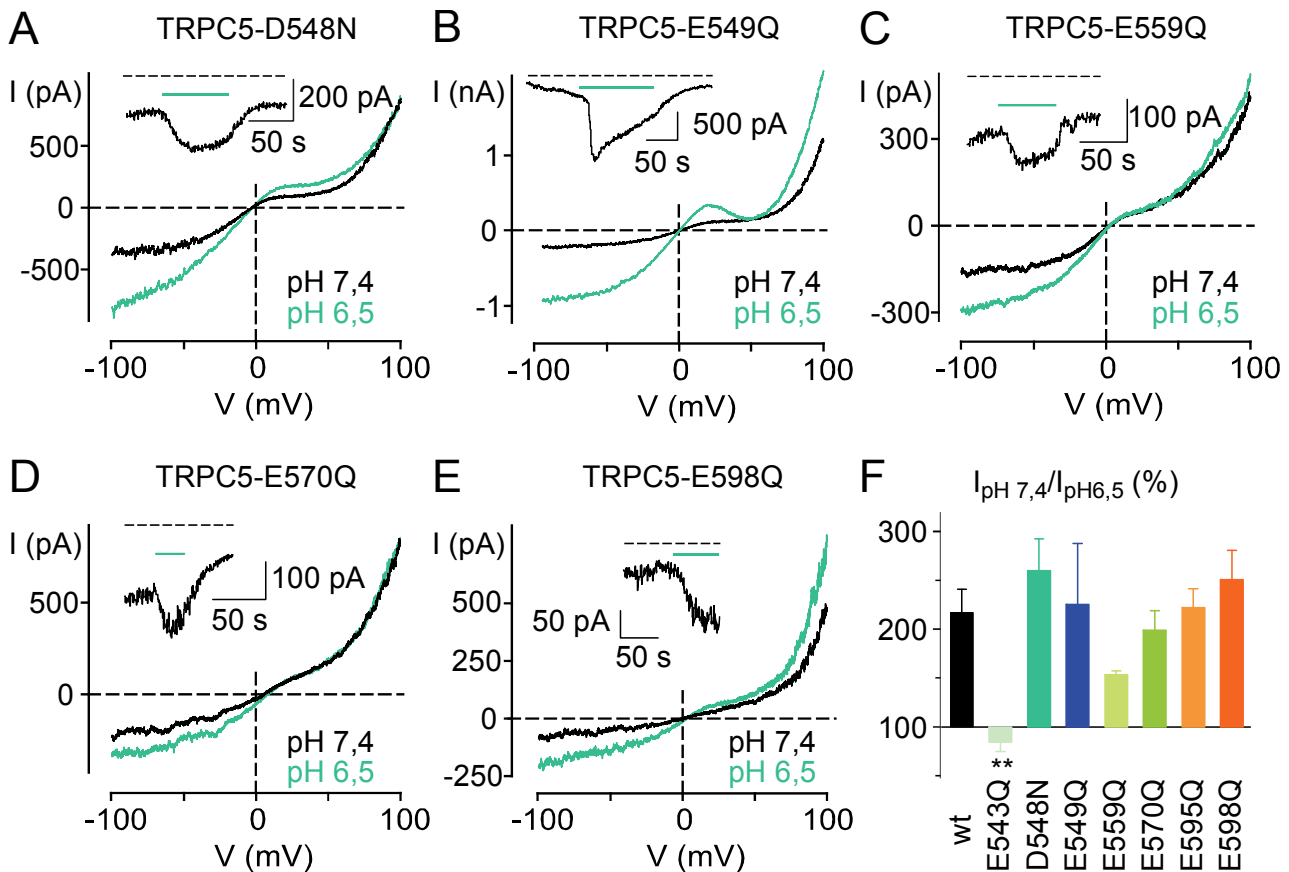


Abbildung 3.15: **Potenzierung der  $GTP\gamma S$ -aktivierten Ströme durch weitere TRPC5-Punktmutanten bei pH 6,5.** Jede der negativ geladenen Aminosäuren zwischen TM5 und TM6 wurde gegen einen neutralen Rest ausgetauscht. A bis E: I-V-Beziehungen der angegebenen Punktmutanten bei jeweils pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). *Inset*, Zeitverlauf der Ströme durch die Mutanten bei -60 mV vor, während und nach dem Wechsel des extrazellulären pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 6,5. F: Zusammenfassung der Effekte von  $H^+$  auf TRPC5 und die untersuchten Punktmutanten. Die Ströme bei pH 6,5 wurden jeweils auf die bei pH 7,4 normiert (-60 mV). Nur bei TRPC5-E543Q blieb eine Potenzierung der Ströme durch niedrigere pH-Werte aus.

### 3.3.4.2. Potenzierung der basalen Ströme

Als nächstes wurde der Effekt der Glutamatreste E543Q und E595Q auf die Potenzierung der basalen Ströme durch TRPC5 untersucht. Wie Abbildung 3.16A (und Abb. 3.17B, *Inset*) zeigt, waren die basalen Ströme der Mutante TRPC5-E543Q ( $-14,0 \pm 3,2$  pA/pF, -50 mV,  $n = 7$ ,  $p = 0,01$  vgl. TRPC5-wt) kurz nach dem

Einbrechen signifikant größer als die des Wildtyps ( $-5,2 \pm 0,9$  pA/pF,  $-50$  mV,  $n = 9$ ). Im Gegensatz dazu war TRPC5-E595Q/E598Q deutlich weniger aktiv (Abb. 3.16B und Abb. 3.17B, *Inset*). HEK293-Zellen, die mit dieser Mutante transfiziert wurden, hatten kurz nach dem Einbrechen eine durchschnittliche Stromdichte von nur  $-0,9 \pm 0,2$  pA/pF ( $-50$  mV,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$  vgl. TRPC5-wt). Durch die Reduktion des extrazellulären pH-Werts wurden die basalen Ströme beider TRPC5-Mutanten verstärkt (Abb. 3.16A und B). Dies war im Falle von

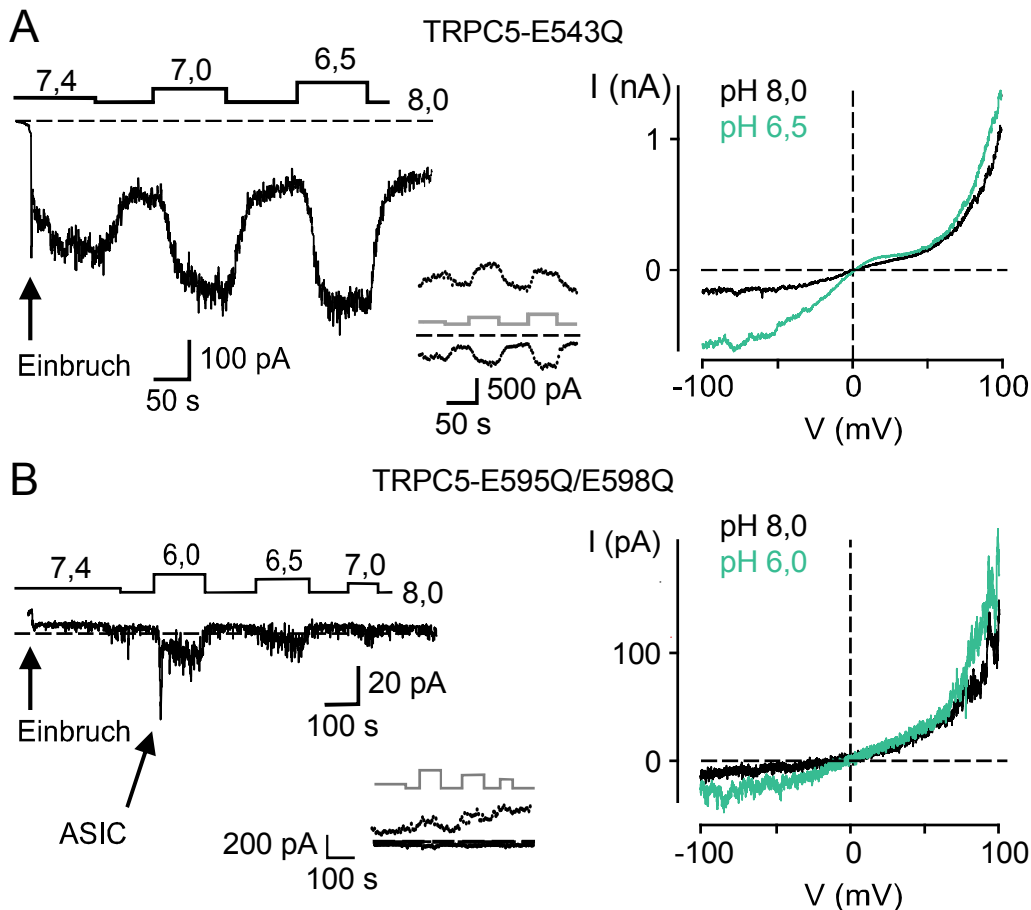


Abbildung 3.16: **Effekte von  $H^+$  auf die basalen Ströme durch die TRPC5-Punktmutanten E543Q und E595Q.** A: Potenzierung der basalen Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts von pH 8,0 auf pH 7,4, pH 7,0 und pH 6,5. *Links*, Zeitverlauf bei  $-50$  mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien sind die Nulllinien. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC5-E543Q, gewonnen durch Spannungsrampen von  $-100$  mV auf  $+100$  mV, bei pH 8,0 (schwarz) und pH 6,5 (blau). B: Gleiches Experiment wie in A, mit TRPC5-E595Q/E598Q. Die basalen Ströme durch diese Mutante waren sehr klein und wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts nur geringfügig erhöht.

TRPC5-E543Q höchst überraschend, da die PLC-abhängig aktivierten Ströme durch diese Mutante durch Senkung des pH-Werts nur blockiert wurden (siehe Kap. 3.3.4.1). Die basalen Ströme wurden jedoch wie beim Wildtyp durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts von pH 8,0 auf pH 7,4, 6,5 und 6,0 potenziert (Abb. 3.17B), mit den größten Effekten bei pH 6,5 ( $-22,3 \pm 6,1$  pA/pF,



n = 5). Auch die Ströme durch TRPC5-E595Q/E598Q wurden durch eine Senkung des pH-Wertes verstärkt, jedoch mit der größten beobachteten Potenzierung bei pH 5,5. Die durchschnittliche Stromdichte betrug hier aber lediglich  $-2,6 \pm 0,5$  pA/pF ( $-50$  mV, n = 11) und unterschied sich daher nicht signifikant von den Werten bei pH 8,0 ( $p = 0,12$ ). Ähnliche Befunde erbrachten auch Experimente mit der Einzel-

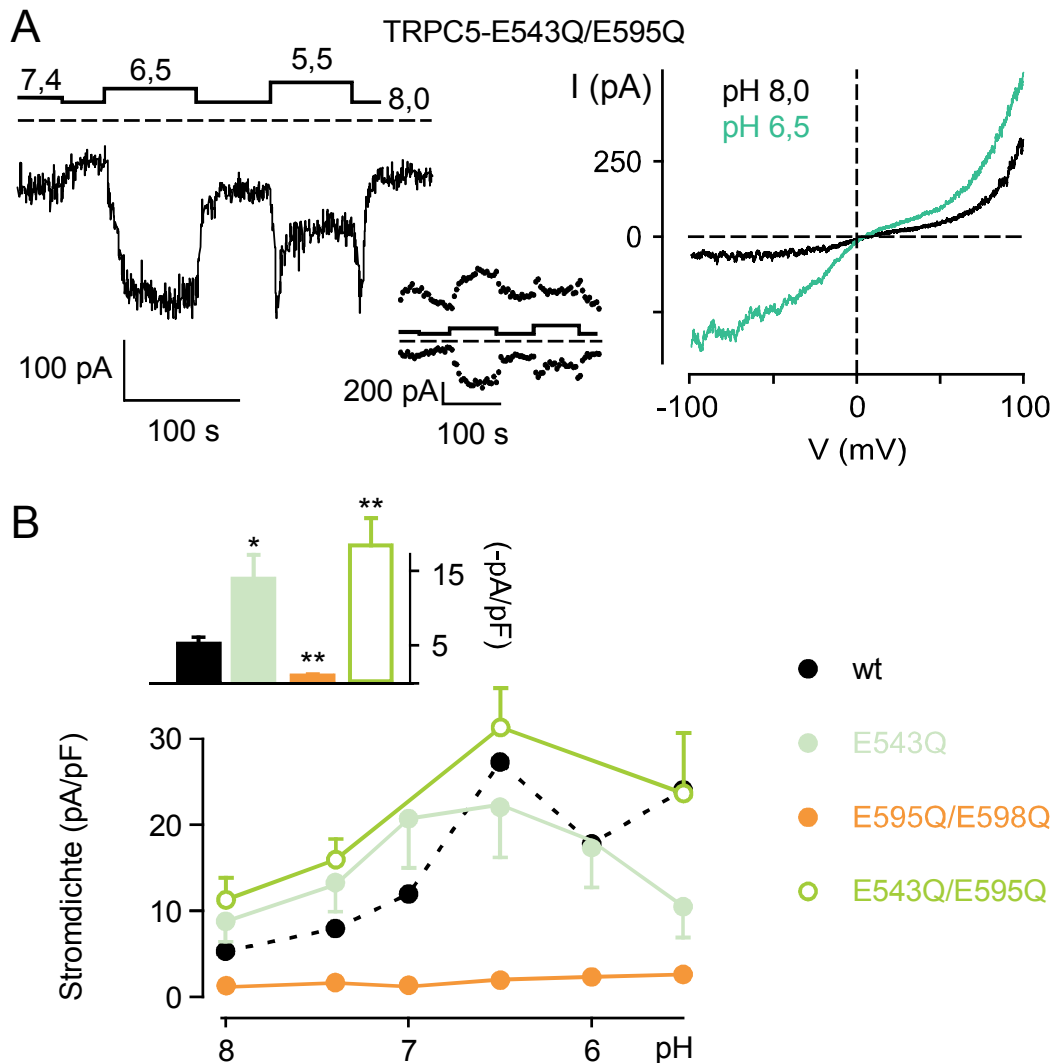


Abbildung 3.17: **Potenzierung der basalen Ströme durch TRPC5-E543Q/E595Q durch Reduktion des pH-Wertes.** A: Basale Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q/E595Q wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Wertes auf pH 6,5 und pH 5,5 potenziert, und bei Erhöhungen auf pH 8,0 inhibiert. *Links*, Zeitverlauf bei  $-60$  mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien sind die Nulllinien. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC5-E543Q/E595Q, gewonnen durch Spannungsrampen von  $-100$  mV auf  $+100$  mV, bei pH 8,0 (schwarz) und pH 6,5 (blau). B: pH-Abhängigkeit der basalen Ströme, angegeben als Stromdichten, durch TRPC5 und die Mutanten E543Q, E595Q sowie E543Q/E595Q. TRPC5-E595Q/E598Q (orange) wurde nach pH-Reduktionen sehr schwach potenziert, während die Mutanten E543Q (hellblau) und E543Q/E595Q (hellgrün) ähnlich große Ströme und pH-Abhängigkeiten wie der Wildtyp (schwarz) aufwiesen. *Inset*, Zusammenfassung der basalen Stromdichten kurz nach Erreichen des Ganzzellmodus in Experimenten mit TRPC5 und TRPC5-Mutanten. Bei TRPC5-E543Q (hellblau) und TRPC5-E543Q/E595Q (hellgrün) waren diese signifikant größer als beim Wildtyp (wt, schwarz), bei TRPC5-E595Q (orange) signifikant niedriger.

mutante TRPC5-E595Q, bei der die Reduktion des pH-Werts auf pH 6,5 ebenfalls nur sehr schwache Antworten hervorrief ( $-0,3 \pm 0,2$  pA/pF,  $-60$  mV,  $n = 6$ ). Die Doppelmutante TRPC5-E543Q/E595Q zeichnete sich wie TRPC5-E543Q durch eine sehr hohe Spontanaktivität aus ( $-18,4 \pm 3,7$  pA/pF,  $-60$  mV,  $n = 13$ ), die durch eine Senkung des extrazellulären pH-Werts noch verstärkt werden konnte

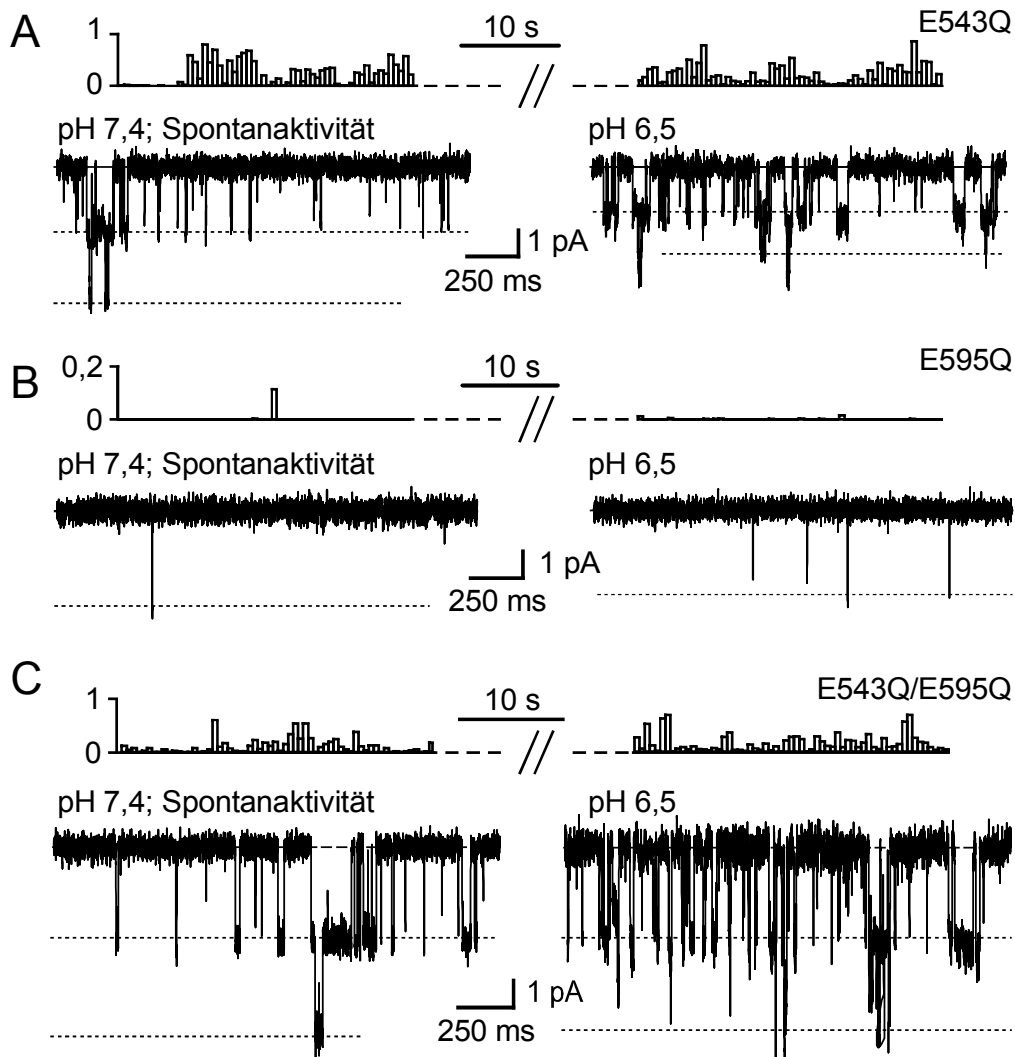


Abbildung 3.18: **Effekte von  $H^+$  auf die Einzelkanalströme der TRPC5-Mutanten E543Q, E595Q und E543Q/E595Q.** A-C: Repräsentative Ausschnitte aus Einzelkanalmessungen im *Outside-Out*-Modus ( $-60$  mV) bei pH 7,4 (*links*) und pH 6,5 (*rechts*) mit TRPC5-E543Q (A), TRPC5-E595Q (B) und TRPC5-E543Q/E595Q (C). Die gestrichelten Linien markieren den geschlossenen Zustand, die gepunkteten Linien die offenen Zustände. *Inset*, Aktivität der Kanäle über längere Zeitabschnitte des jeweiligen Experiments, ausgedrückt als Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_o$ ) gegenüber der Zeit.

(Abb. 3.17A). Bei pH 6,5 betrug die durchschnittliche Stromdichte in  $n = 10$  Experimenten  $-31,4 \pm 4,6$  pA/pF ( $-60$  mV,  $p < 0,01$  vgl. pH 7,4). Demnach stellt eine zusätzliche Mutation des Glutamatrests E543 nicht nur die basale Aktivität der Mutante TRPC5-E595 wieder her, sondern auch das Ausmaß der Potenzierung seiner Ströme durch die Reduktion des extrazellulären pH-Werts.

Um die oben beschriebenen Effekte näher zu untersuchen, wurden die Einzelkanalströme der Mutanten TRPC5-E543Q, -E595Q und E543Q/E595Q im *Outside-Out*-Modus analysiert. Repräsentative Abschnitte aus den Messungen sind in Abbildung 3.18 gezeigt und die Zusammenfassung aller Ergebnisse in Abbildung 3.19. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen an TRPC5-E595Q/E598Q hatten die Mutanten, in denen E595 neutralisiert war, bei pH 7,4 eine signifikant größere Einzelkanalamplitude als TRPC5-wt. Bei einem Haltepotential von -60 mV betrug diese in Experimenten mit TRPC5-E595Q  $-3,41 \pm 0,05$  pA ( $n = 5$ ,  $p < 0,01$  vgl. TRPC5-wt) und in Experimenten mit TRPC5-E543Q/E595Q  $-3,31 \pm 0,16$  pA ( $n = 6$ ,

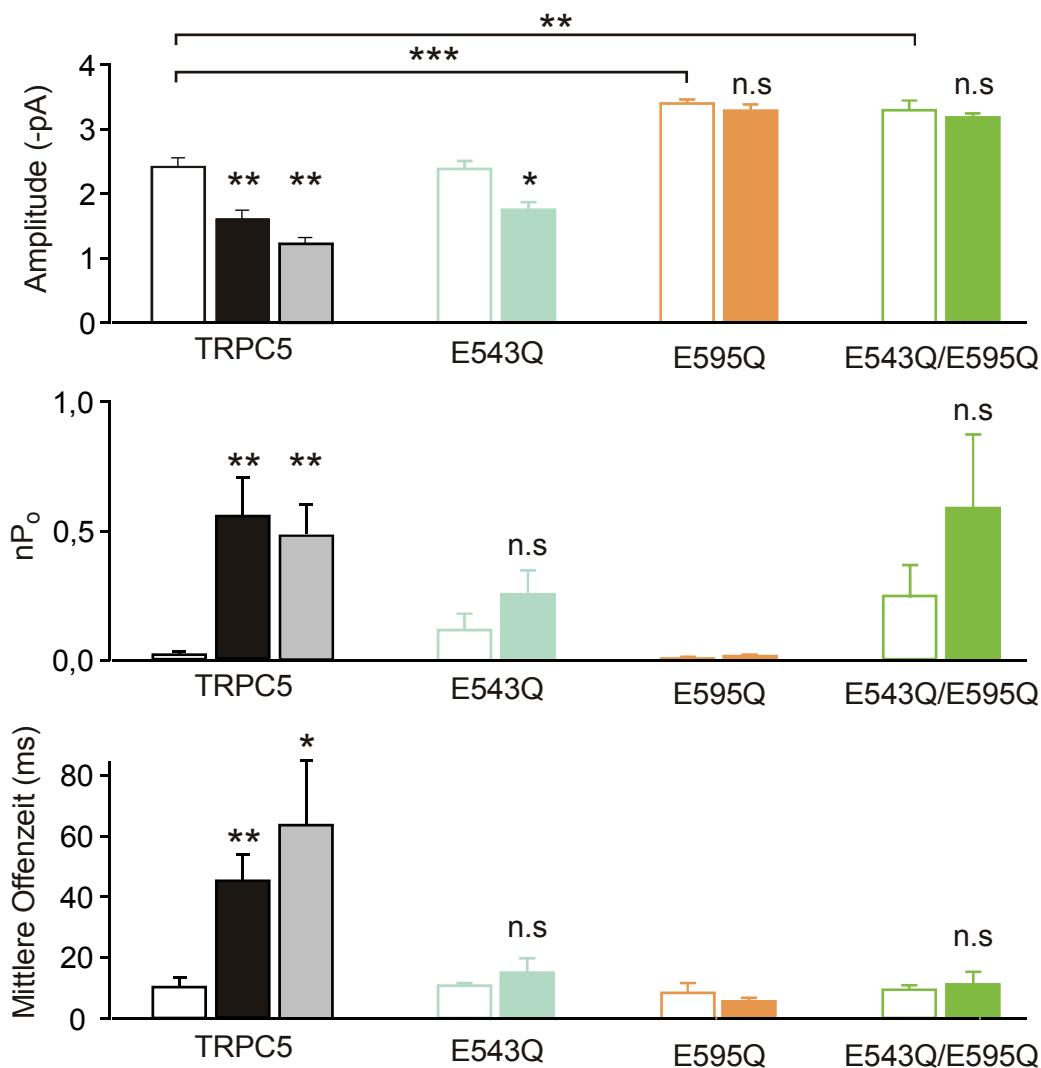


Abbildung 3.19: **Eigenschaften der Einzelkanäle von TRPC5 und Mutanten bei pH 7,4 und pH 6,5 im *Outside-Out*-Modus.** Die durchschnittlichen Werte bei pH 7,4 sind durch weiße, die bei pH 6,5 durch gefüllte Balken dargestellt. Für TRPC5-wt sind zusätzlich die Effekte von 100 µM Gd<sup>3+</sup> (grau) zusammengefasst. *Oben*, TRPC5-Mutanten, in denen E595 neutralisiert wurde, hatten einen signifikant höheren Einzelkanalstrom (-60 mV) bei pH 7,4, der bei pH 6,5 kaum abnahm. *Mitte*, Im Gegensatz zu TRPC5-wt zeigte keine der untersuchten Mutanten eine signifikante Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (nP<sub>o</sub>) nach pH-Reduktion auf pH 6,5. *Unten*, Die mittlere Offenzeit von TRPC5-wt war bei pH 6,5 im Vergleich zu pH 7,4 signifikant erhöht, ein Effekt, der bei keiner der Mutanten auftrat.

$p < 0,01$  vgl. TRPC5-wt). TRPC5-E543Q hatte hingegen eine ähnliche Einzelkanal-amplitude wie der Wildtyp. Einen deutlich höheren Level an spontaner Aktivität als TRPC5-wt hatten im Gegensatz dazu alle Mutanten, in denen der Glutamatrest E543 zu Glutamin mutiert worden war (TRPC5-E543Q und TRPC5-E543Q/E595Q). Diese Erhöhung resultierte mehr aus einer erhöhten Anzahl an Öffnungen (Frequenz) als aus einer erhöhten mittleren Offenzeit der Kanäle. Übereinstimmend mit den Ganzzell-Strömen hatten TRPC5-E595Q-Einzelkanäle eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit, die zu klein für eine statistische Analyse der Kinetik war ( $n = 4$ ). Die Reduktion des extrazellulären pH-Werts von pH 7,4 auf pH 6,5 führte in den meisten Versuchen mit TRPC5-E543Q oder TRPC5-E543Q/E595Q zu einer Erhöhung der Aktivität, die aus einer Steigerung der Anzahl der Öffnungseignissen, nicht aber aus einer Verlängerung der mittleren Offenzeiten resultierte (Abb. 3.18A, C und 3.19). Wie auch die Experimente im *Whole-Cell*-Modus gezeigt haben, hatten diese Kanäle jedoch schon bei neutralen pH-Werten (pH 7,4) eine sehr hohe Aktivität, was dazu führte, dass die Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit infolge einer Absenkung des pH-Werts statistisch nicht signifikant war. Im Falle von TRPC5-E543Q war die Senkung des extrazellulären pH-Werts wie beim Wildtyp mit einer Reduktion der Einzelkanal-amplitude um  $26 \pm 2\%$  ( $p < 0,05$  vgl. pH 7,4) verbunden. Die Einzelkanal-amplituden von TRPC5-E595Q ( $3 \pm 1\%$ ,  $p = 0,4$  vgl. pH 7,4) und der Doppelmutante TRPC5-E543Q/E595Q ( $3 \pm 3\%$ ,  $p = 0,56$  vgl. pH 7,4), die bei pH 7,4 ohnehin schon deutlich größer waren als die des Wildtyps, wurden durch pH 6,5 jedoch kaum reduziert. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Effekt zur Potenzierung der spontanen Ganzzell-Ströme durch die Mutanten, in denen E595 neutralisiert ist, beiträgt.

### 3.3.5. Effekt extrazellulärer $H^+$ auf andere TRPC-Kanäle

An dieser Stelle stellte sich die Frage, welche Effekte extrazelluläre  $H^+$  auf die Ströme durch andere TRP-Kanäle ausüben. In Kapitel 3.3.1 wurde bereits gezeigt, dass TRPC4, wie TRPC5, einen Glutamatrest an der proximalen Stelle (E545) sowie das distale EFTE-Motiv (AS 594 bis 597) besitzt. TRPC6 hingegen fehlen negativ geladene Reste an ähnlichen Positionen. Sowohl TRPC4 als auch TRPC6 konnten in HEK293-Zellen funktionell exprimiert werden, und die Infusion von  $GTP\gamma S$  (TRPC4) bzw.  $AlF_4^-$  (TRPC6) ins Cytosol führte zu transienten Einwärtsströmen beim Haltepotential (Abb. 3.20A und C). Die mittleren Stromdichten der PLC-abhängig aktivierten Ströme durch TRPC4 lagen bei  $-45 \pm 13$  pA/pF (-60 mV,  $n = 13$ ) und durch TRPC6 bei  $-86 \pm 35$  pA/pF (-50 mV,  $n = 6$ ).

Passend zum Vorhandensein negativ geladener Seitenketten an Positionen analog zu TRPC5-E543 und TRPC5-E595, wurden die Ströme durch TRPC4 durch eine Reduktion des extrazellulären pH-Werts auf pH 6,5 nahezu verdoppelt ( $188 \pm 18\%$ ,

-60 mV,  $n = 8$ ,  $p < 0,001$  vgl. pH 7,4, Abb. 3.20A und B). Wie bei TRPC5 war die pH-abhängige Potenzierung von TRPC4 bei negativen Potentialen deutlicher ausgeprägt als bei positiven ( $115 \pm 4\%$ ,  $n = 8$ , pH 6,5, +100 mV,  $p < 0,01$  vgl. pH 7,4). Auch die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts extrazellulärer  $H^+$  auf Ströme durch TRPC4 war ähnlich der von TRPC5. Jedoch war im Falle von TRPC4 die Potenzierung bei pH 6,0 viel kleiner als bei TRPC5 und bei pH 5,5 wurden die Ströme bereits fast vollständig inhibiert.

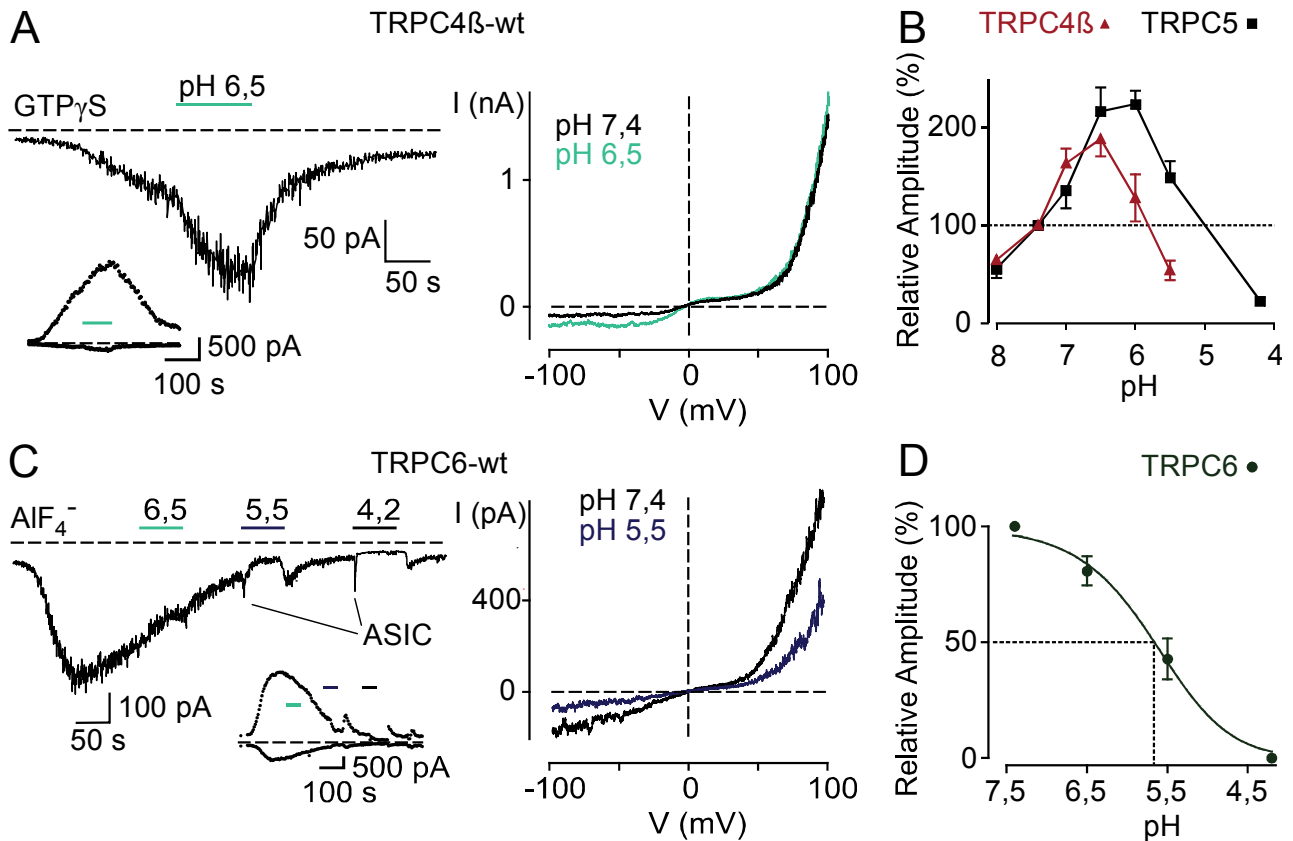


Abbildung 3.20: **Effekte von  $H^+$  auf die PLC-vermittelten Ströme durch TRPC4 und TRPC6.** A: GTP $\gamma$ S - induzierte Ganzzellströme durch TRPC4 wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts von pH 7,4 auf pH 6,5 potenziert. *Links*, Zeitverlauf bei -60 mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien zeigen 0 pA an. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC4, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,5 (blau). Ähnlich TRPC5 sind die potenzierenden Effekte von  $H^+$  bei negativen Potentialen stärker ausgeprägt als bei positiven. B: pH-Abhängigkeit der GTP $\gamma$ S-induzierten Ströme durch TRPC4 (rot) relativ zum Strom bei pH 7,4 (100%). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Effekte von  $H^+$  auf GTP $\gamma$ S-aktivierte Ströme durch TRPC5 (schwarz) ist zum Vergleich dargestellt. C: AIF $_4^-$ -induzierte Ganzzellströme durch TRPC6 wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts auf pH 6,5, pH 5,5 und pH 4,2 nur inhibiert. *Links*, Zeitverlauf bei -50 mV und  $\pm 100$  mV (*Inset*). Die gestrichelten Linien zeigen 0 pA an. *Rechts*, I-V-Beziehungen von TRPC6, gewonnen durch Spannungsrampen von -100 mV auf +100 mV, bei pH 7,4 (schwarz) und pH 5,5 (dunkelblau). D: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des  $H^+$ -abhängigen Blocks der Ströme durch TRPC6. Ein Fit mit der Hill-Funktion (kontinuierliche schwarze Linie) ergab eine  $pIC_{50}$  von  $5,7 \pm 0,1$ .

Die PLC-abhängig aktivierten Ströme durch TRPC6 konnten hingegen durch eine Erhöhung der extrazellulären  $[H^+]$  nicht potenziert werden. Im Gegenteil wurden sie bei allen getesteten pH-Werten ( $< \text{pH } 7,4$ ) inhibiert (Abb. 3.20C und D). Die Inhibition war konzentrationsabhängig mit einem  $\text{pIC}_{50}$  von  $5,7 \pm 0,1$  ( $-50 \text{ mV}$ ). Auch basale Ströme durch TRPC6 wurden nicht verstärkt, wenn der extrazelluläre pH-Wert gesenkt wurde (Daten nicht gezeigt). Die durchschnittliche Stromdichte kurz nach dem Einbrechen betrug in diesen Experimenten  $-11,0 \pm 1,6 \text{ pA/pF}$  ( $n = 5$ ,  $\text{pH } 7,4$ ,  $-50 \text{ mV}$ ) und war damit mehr als doppelt so hoch wie bei TRPC5 ( $-5,2 \pm 2,7 \text{ pA/pF}$ ,  $n = 9$ ,  $-50 \text{ mV}$ ,  $p = 0,004$ ). Im Gegensatz zu TRPC5 wurden die basalen Ströme durch TRPC6 in allen Experimenten durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts von  $\text{pH } 8,0$  auf  $\text{pH } 6,5$ ,  $5,5$  und  $4,2$  inhibiert.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts untermauern die Bedeutung der zwei Glutamatreste an den proximalen und distalen Flanken in der Region zwischen TM5 und TM6 für die Sensitivität von TRPC4 und TRPC5 gegenüber  $H^+$ . Außerdem deuten diese Daten darauf hin, dass die Potenzierung der Ströme durch extrazelluläre  $H^+$  kein generelles Merkmal von TRPC-Kanälen ist, sondern vielmehr ein Charakteristikum der Gruppe 4-TRPC-Kanäle.

### 3.4. Ionenpermeation durch TRPC5

#### 3.4.4. Experimente zum Umkehrpotential

TRPC5 wird in den meisten Studien, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, als ein unselektiver Kationenkanal beschrieben, der sowohl für mono- als auch für divalente Kationen permeabel ist (Plant & Schaefer, 2005). Hochselektive Kanäle, die hauptsächlich für eine Ionenart permeabel sind, besitzen einen Selektivitätsfilter innerhalb der Pore, welcher die Passage von Ionen zulässt bzw. verhindert. Auch TRPC5 muss einen solchen Filter besitzen, da er für Anionen, wie z.B.  $\text{Cl}^-$ , impermeabel ist (Schaefer et al., 2000). Es soll in diesem Kapitel geklärt werden, ob und wie gut dieser Selektivitätsfilter zwischen verschiedenen Arten von Kationen unterscheiden kann. Elektrophysiologische Experimente, die diese Frage beantworten, werden klassischerweise unter biionischen Konditionen durchgeführt, was heißt, dass sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Lösung jeweils nur eine Ionenspezies enthalten. Die Lage des Umkehrpotentials eines Kanals unter diesen Bedingungen drückt dann aus, wie gut die extrazelluläre Ionenspezies im Vergleich zur intrazellulären durch die Pore eines Kanals permeieren kann, und ist demnach ein Maß für die Selektivität. Im Falle von TRPC5 erschien ein solcher Versuchsaufbau jedoch nicht praktikabel, da seine Aktivität zu stark von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) abhängt (Schaefer et al., 2000). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie intrazelluläre Lösung würde dazu führen, dass TRPC5 gar nicht oder nur

in einigen Versuchen sehr schlecht zu aktivieren wäre. Daher enthielt die intrazelluläre Lösung in den nachfolgend beschriebenen Experimenten stets ein Gemisch aus  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie  $\text{Li}_4\text{-GTP}\gamma\text{S}$  als indirekten Aktivator von TRPC5 (siehe Kap. 2.4.4.1), und wurde nicht verändert.  $\text{Cs}^+$  (135 mM) stellte dabei die vorwiegende Kationenspezies dar, während die Aktivitäten der anderen Kationen (jeweils  $< 5$  mM) vernachlässigbar gering waren. Im Gegensatz zur intrazellulären Lösung wurden verschiedene extrazelluläre Lösungen eingesetzt. Diese enthielten nominell jeweils nur eine Kationenspezies in Konzentrationen zwischen 0 und 150 mM ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) bzw. zwischen 0 und 100 mM ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Um die Osmolarität in allen Lösungen konstant zu halten, wurden gemäß Tabelle 3.1 entsprechende Mengen an  $\text{NMDG}^+$ , einem nichtelementaren Kation, hinzugefügt. Auf die geringe Permeabilität von TRPC5 für  $\text{NMDG}^+$  wurde bereits in früheren Studien hingewiesen (Schaefer *et al.*, 2000, Jung *et al.*, 2003), so dass dieses Kation für den Versuchsaufbau als weitgehend störungsfrei angesehen werden konnte. Es soll außerdem darauf hingewiesen werden, dass in keiner der extrazellulären Lösungen Chelatoren (z.B. EGTA) eingesetzt wurden, was vermutlich die Präsenz extrem geringer Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zur Folge hatte (siehe Kap. 2.4.4.1). Auch dies dürfte jedoch die Umkehrpotentiale von TRPC5 kaum beeinflussen.

Tabelle 3.1: **Konzentrationen an  $\text{NMDG}^+$  (in mM) in extrazellulären Lösungen, die auf mono- ( $\text{X}^+$ ) und divalenten ( $\text{Y}^{2+}$ ) Kationen basierten.** Die Experimente zum Umkehrpotential wurden mit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  sowie  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt.

$[\text{X}^+]$	$[\text{NMDG}^+]$	$[\text{Y}^{2+}]$	$[\text{NMDG}^+]$
0	150	0	150
5	145	5	142,5
10	140	10	135
20	130	20	120
50	100	50	75
100	50	100	0
150	0		

Wie in Abbildung 3.21A und C gezeigt ist, hatten die I-V-Beziehungen von TRPC5, die durch Spannungsrampen von  $-100$  mV bis  $+100$  mV (400 ms) gewonnen wurden, mit 150 mM extrazellulärem Natrium ( $[\text{Na}^+]_o$ ) ein Umkehrpotential von  $-0,4 \pm 1,1$  mV ( $n = 14$ ). Weil die Lösung auf der intrazellulären Seite der Membran hauptsächlich aus  $\text{Cs}^+$  (ca. 145 mM) bestand, untermauert dies die schwache Selektivität von TRPC5 für monovalente Kationen. Mit kleiner werdenden  $[\text{Na}]_o$  verschob sich das Umkehrpotential konzentrationsabhängig zu negativeren

Potentialen (Abb. 3.21A und C). Die Verschiebung betrug  $37,9 \pm 1,3$  mV pro 10-facher Konzentrationsänderung (linearer Fit der Daten, nicht gezeigt), was deutlich von der Nernst-Gleichung abwich (siehe Kap. 2.4.2.1). Diese liegt dem Unabhängigkeitsprinzip zugrunde und sieht eine Verschiebung der Umkehrpotentiale von etwa 58 mV pro 10-facher Konzentrationsänderung vor. Auch in extrazellulären Lösungen, in denen die  $\text{Cs}^+$ -Konzentration variiert wurde, war der Anstieg der Umkehrpotentiale deutlich kleiner, als durch die Nernst-Gleichung vorhergesagt wird (Linearer Fit mit  $41,4 \pm 2,2$  mV pro 10-facher Konzentrationserhöhung nicht gezeigt, siehe Daten in Abb. 3.21B und D). Abweichungen vom Unabhängigkeitsprinzip deuten für gewöhnlich auf die Anwesenheit von hochaffinen Bindungsstellen in der Pore hin, die den unabhängigen Flux der Ionen durch einen Kanal behindern, und sind bereits in vielen Fällen, bspw. an spannungsabhängigen Natriumkanälen, beobachtet worden (Begenisich & Cahalan, 1980). Im hier verwendeten Versuchsaufbau könnte der abgeschwächte konzentrationsabhängige Anstieg der Umkehrpotentiale (Abb. 3.21C und D) jedoch auch andere Ursachen haben. Zum einen waren die Einwärtsströme durch TRPC5 bei geringen extrazellulären Konzentrationen an  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  teilweise sehr klein und durch den Einfluss von Kontaminationen (Leckströme oder Ionenströme durch andere, endogene Kanäle) mehr fehlerbehaftet als größere Ströme durch TRPC5. Als Beispiele seien an dieser Stelle die Ströme bei -100 mV in Lösungen mit lediglich 5 mM  $[\text{Na}^+]_o$  ( $-5,3 \pm 0,8$  pA/pF,  $n = 6$ , Abb. 3.21A) bzw. 5 mM  $[\text{Cs}^+]_o$  ( $-5,7 \pm 1,6$  pA/pF,  $n = 6$ , Abb. 3.21B) aufgeführt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die relativ großen Abweichungen von der Nernst-Geraden allein durch Kontaminationen aufgrund zu kleiner Ströme zustande kommen. Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt wurde daher mit dem möglichen Vorhandensein einer geringen Permeabilität von TRPC5 für  $\text{NMDG}^+$  ins Auge gefasst.  $\text{NMDG}^+$  wurde in umso größeren Konzentrationen eingesetzt, je kleiner die Konzentrationen an  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Cs}^+$  waren (Tab. 3.1), und könnte damit für die steigenden Abweichungen von der Nernst-Gerade bei kleiner werdenden  $[\text{Na}^+]_o$  bzw.  $[\text{Cs}^+]_o$  verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, wurden mit Hilfe von Gleichung G3.1 die theoretischen Umkehrpotentiale von TRPC5 unter Berücksichtigung einer Leitfähigkeit sowohl für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cs}^+$  als auch für  $\text{NMDG}^+$  berechnet. Gleichung G3.1 ist aus der Goldman-

$$V_{\text{rev}} - V_{\text{LJ}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{X}^+]_o + \frac{P_{\text{NMDG}}}{P_{\text{X}}} [\text{NMDG}^+]_o}{\frac{P_{\text{Cs}}}{P_{\text{X}}} [\text{Cs}^+]_i} \quad (\text{G3.1})$$

**Gleichung G3.1:**  $V_{\text{rev}}$ : Umkehrpotential.  $R, T, F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $[\text{X}^+]_o$  und  $[\text{NMDG}^+]_o$ : extrazelluläre Aktivitäten an  $\text{Na}^+/\text{Cs}^+$  ( $\text{X}^+$ ) bzw.  $\text{NMDG}^+$ .  $[\text{Cs}^+]_i$ : intrazelluläre  $\text{Cs}^+$ -Aktivität.  $P_{\text{NMDG}}$ ,  $P_{\text{Cs}}$  und  $P_{\text{X}}$ : Permeabilitäten von TRPC5 für  $\text{NMDG}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  oder  $\text{X}^+$  ( $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cs}^+$ ).  $V_{\text{LJ}}$ : Liquid Junction Potential = +8,5 mV (Theorie und Herleitung, siehe Kap. 2.4.2.1 und 2.4.4.2.)



Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK) abgeleitet worden, die wie die Nernst-Gleichung unabhängigen Ionenflux durch die Pore eines Kanals voraussetzt, jedoch die Einbeziehung von mehr als einer permeierenden Ionenspezies auf jeder Seite der

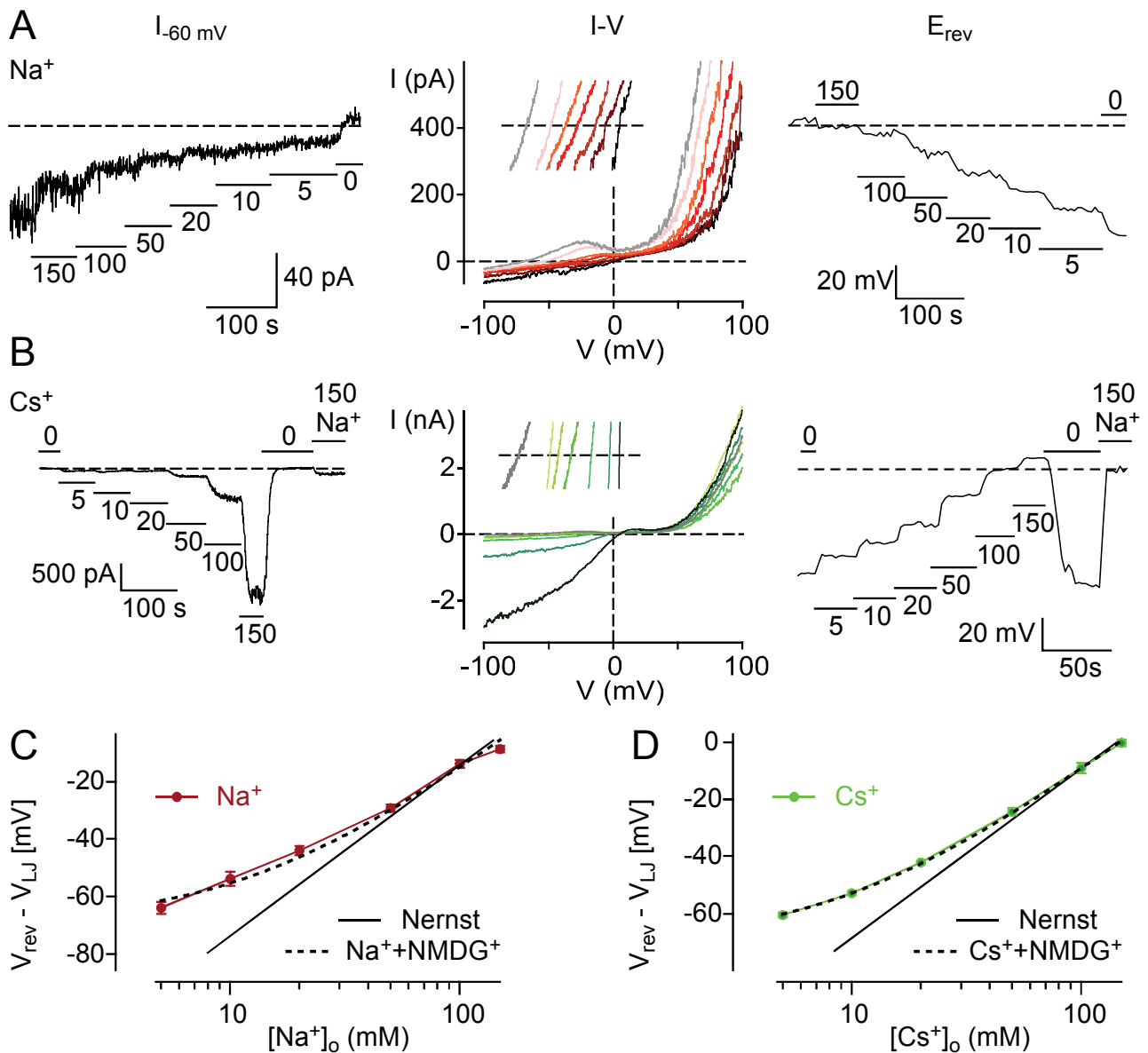


Abbildung 3.21: **Konzentrationsabhängigkeit der Permeation von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cs}^+$  durch TRPC5.** A: Repräsentatives Experiment, das die mithilfe von  $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$  aktivierten Ströme durch TRPC5 bei verschiedenen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen ( $[\text{Na}^+]_o$ ) zeigt. *Links*, Zeitverlauf bei  $-60\text{ mV}$ . Die schwarzen Balken geben die Dauer der Applikation verschiedener  $[\text{Na}^+]_o$  in mM an. *Mitte*, I-V-Beziehungen von TRPC5 bei ansteigenden  $[\text{Na}^+]_o$  (von hell nach dunkel). *Inset*, Ausschnitt der Ströme zwischen  $-10\text{ pA}$  und  $+10\text{ pA}$ . Die Spannungsachse ist im Vergleich zum großen Graphen nicht verschoben. *Rechts*, Zeitverlauf der Umkehrpotentiale von TRPC5, die sich mit abnehmender  $[\text{Na}^+]_o$  zu hyperpolarisierenden Potentialen verschoben. B: Abbildung wie in A, nur mit Experiment mit  $\text{Cs}^+$  statt  $\text{Na}^+$  in der extrazellulären Lösung. C und D: Beziehung zwischen den Umkehrpotentialen von TRPC5 zu  $[\text{Na}^+]_o$  (C) bzw.  $[\text{Cs}^+]_o$  (D). Rote/Grüne Kurve: experimentell gewonnene Daten. Gestrichelter schwarzer Graph: theoretisches Umkehrpotential nach Gleichung G3.1. Kontinuierliche schwarze Gerade: Anstieg von  $58\text{ mV}$  pro 10facher Konzentrationsänderung gemäß dem Unabhängigkeitsprinzip (Nernst) zu Vergleichszwecken; die horizontale Position wurde abgeschätzt.

Membran erlaubt (siehe Kap. 2.4.2.1). Die Permeation divalenter Kationen in Auswärtsrichtung durch TRPC5 wurde hier aufgrund der geringen Aktivitäten von  $Mg^{2+}$  (1,1 mM) und  $Ca^{2+}$  (100 nM) in der Pipettenlösung vernachlässigt. Wie in Abbildung 3.21C und D (gestrichelte schwarze Graphen) gezeigt, konnten die Umkehrpotentiale von TRPC5 tatsächlich sowohl in  $Na^+$ - als auch in  $Cs^+$ -basierten, extrazellulären Lösungen unter Anwendung von Gleichung G3.1 mit Werten von  $P_{NMDG}/P_{Na}$ :  $0,08 \pm 0,01$ ,  $P_{NMDG}/P_{Cs}$ :  $0,06 \pm 0,00$  sowie  $P_{Cs}/P_{Na}$ :  $1,31 \pm 0,08$  korrekt vorhergesagt werden. Der Verlauf der theoretischen Umkehrpotentiale gibt sowohl den fast linearen, Nernst-ähnlichen Verlauf der Umkehrpotentiale bei hohen  $[Na^+]_o$  bzw.  $[Cs^+]_o$  wieder (jeweils  $\geq 50$  mM), als auch die Abkehr von der Nernst-Geraden bei größer werdenden  $[NMDG^+]_o$  und kleineren  $[Na^+]_o$  bzw.  $[Cs^+]_o$ . Die theoretischen Umkehrpotentiale sprechen daher dafür, dass  $Na^+$  und  $Cs^+$  bei der Permeation durch TRPC5 die Unabhängigkeitsregel erfüllen. Zusätzlich ist eine sehr geringe Permeabilität für  $NMDG^+$  vorhanden, die den Nernst'schen Verlauf der Umkehrpotentiale bei verschiedenen  $[Na^+]_o$  und  $[Cs^+]_o$  maskiert. Die Permeabilität von  $Cs^+$  gegenüber  $Na^+$  (1,31) liegt nahe 1 und untermauert die schwache Selektivität von TRPC5 für Alkalimetalle. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse ist die Existenz einer (oder mehrerer) Bindungsstelle(n) für monovalente Kationen in der Pore von TRPC5 unwahrscheinlich.

$$\frac{P_Y}{P_{Na}} = \frac{\exp \frac{F(V_{rev} - V_{Korr.})}{RT} \frac{P_{Cs}}{P_{Na}} [^*Cs^+]_i - \frac{P_{NMDG}}{P_{Na}} [^*NMDG^+]_o}{4 [^*Y^{2+}]_o} \left( 1 + \exp \frac{F(V_{rev} - V_{Korr.})}{RT} \right) \quad (G3.2a)$$

$$V_{rev} - V_{Korr.} = \frac{RT}{F} \ln \frac{4 \frac{P_Y}{P_{Na}} [^*Y^{2+}]_o + \frac{P_{NMDG}}{P_{Na}} [^*NMDG^+]_o}{\frac{P_{Cs}}{P_{Na}} [^*Cs^+]_i} \quad (G3.2b)$$

**Gleichungen G3.2a und G3.2 b:**  $V_{rev}$ : Umkehrpotential.  $R, T, F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $[^*Y^{2+}]_o$  und  $[^*NMDG^+]_o$ : extrazelluläre Aktivitäten an  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  ( $Y^{2+}$ ) bzw.  $NMDG^+$ .  $[^*Cs^+]_i$ : intrazelluläre  $Cs^+$ -Aktivität.  $P_Y$ ,  $P_{NMDG}$ ,  $P_{Cs}$  und  $P_{Na}$ : Permeabilitäten von TRPC5 für  $Y^{2+}$  ( $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ),  $NMDG^+$ ,  $Cs^+$  bzw.  $Na^+$ .  $V_{Korr.}$ : Korrektur der Umkehrpotentiale, welche die *liquid junction*-Potentiale und die Änderungen des Elektrodenpotentials an der Badelektrode beinhaltet. Theorie und Herleitung: Kap. 2.4.2.1. Aktivitäten: Kap. 2.4.4.2.

In den folgenden Experimenten wurde das Verhalten der Umkehrpotentiale von TRPC5 in Abhängigkeit von divalenten Kationen unterschiedlicher Konzentration untersucht ( $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ , Tab. 3.1 und Abb. 3.22A und B). Mit 100 mM  $Mg^{2+}$  auf der extrazellulären Seite der Membran hatte TRPC5 ein Umkehrpotential von  $8,7 \pm 1,8$  mV ( $n = 5$ ). Es verschob sich um  $38,7 \pm 0,6$  mV pro 10facher Konzen-

trationsänderung in Richtung negativerer Potentiale, wenn die extrazelluläre Magnesiumkonzentration ( $[Mg^{2+}]_o$ ) reduziert wurde. Nach dem Unabhängigkeitsprinzip wäre ein etwas steilerer Anstieg zu erwarten gewesen (ca. 44,5 mV pro 10facher Konzentrationsänderung, GHK, schwarze durchgezogene Linie). Die Abweichung vom Unabhängigkeitsprinzip konnte auch in diesem Fall durch eine

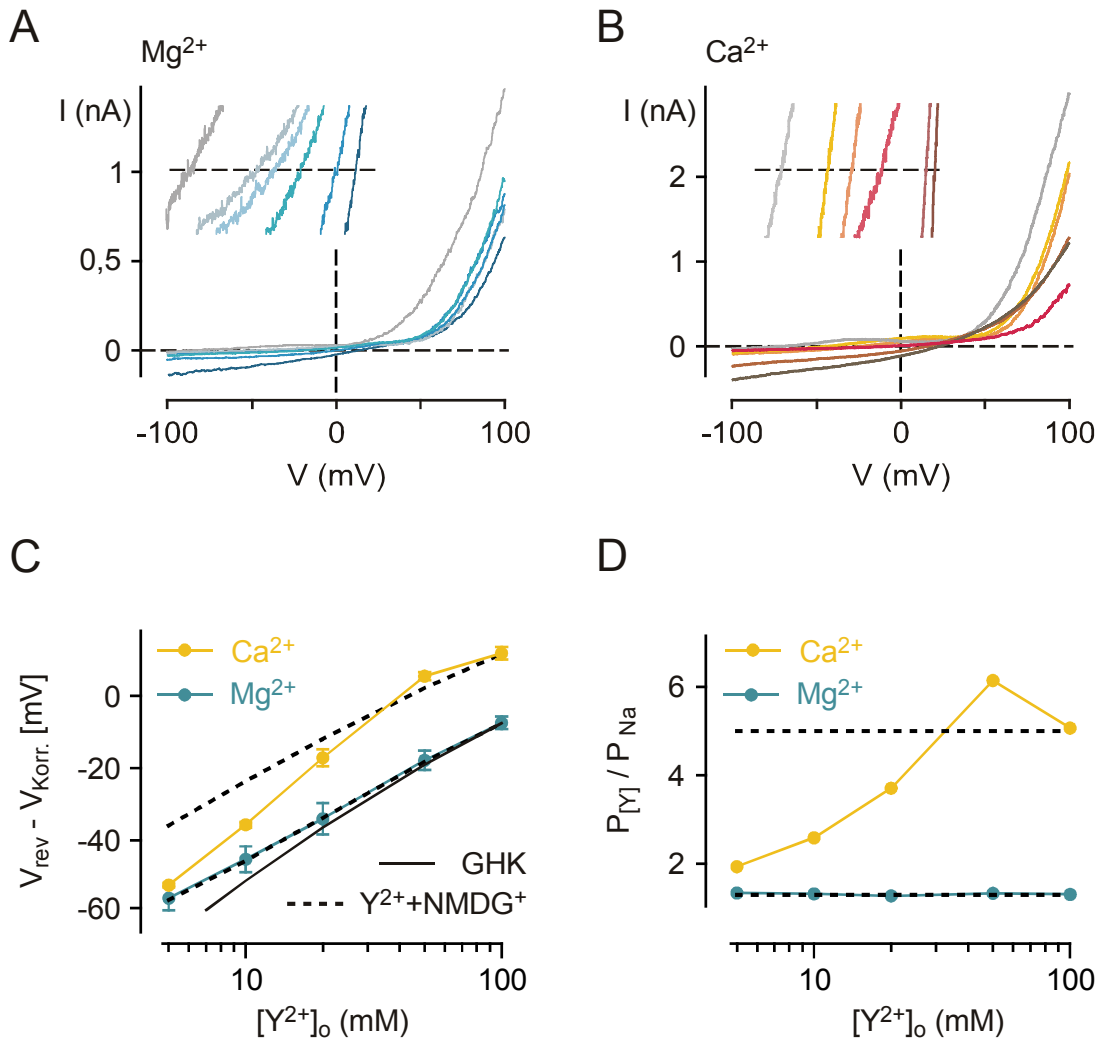


Abbildung 3.22: **Konzentrationsabhängigkeit der Permeation von  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  durch TRPC5.** A und B: I-V-Beziehungen von TRPC5 bei ansteigenden extrazellulären  $Mg^{2+}$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (A:  $[Mg^{2+}]_o$ , B:  $[Ca^{2+}]_o$ , jeweils von hell nach dunkel). *Inset*, Ausschnitt der Ströme zwischen -10 pA und +10 pA. Die Spannungsachse ist im Vergleich zum großen Graphen nicht verschoben. C: Beziehung zwischen den Umkehrpotentialen von TRPC5 zu  $[Mg^{2+}]_o$  und  $[Ca^{2+}]_o$ . Zu beachten ist, dass die korrigierten Umkehrpotentiale ( $V_{rev} - V_{Korr.}$ ) gezeigt sind. Die Korrekturen beinhalten sowohl das *Liquid Junction Potential* ( $V_{LJ}$ ) als auch die Änderungen des Elektrodenpotentials an der Badelektrode ( $V_{El}$ , siehe Kap. 2.4.4.2). Blau, gelb = experimentell gewonnene Daten. Kontinuierliche schwarze Gerade = Voraussage nach dem Unabhängigkeitsprinzip mit einem Anstieg von ca. 44,5 mV pro 10facher Konzentrationserhöhung. Gestrichelte schwarze Graphen = theoretische Umkehrpotentiale nach Gleichung G3.2a mit  $P_{Ca}/P_{Na} = 5,00$  und  $P_{Mg}/P_{Na} = 1,30$ . D: Relative Permeabilitäten von TRPC5 für  $Mg^{2+}$  bzw.  $Ca^{2+}$  im Vergleich zu  $Na^+$  in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden divalenten Kationen. Die Werte wurden mit Gleichung G3.2b aus den Umkehrpotentialen (siehe C) ermittelt. Darstellung der Graphen wie in C.

Leitfähigkeit von TRPC5 für das nichtelementare Kation NMDG<sup>+</sup> erklärt werden, die zu einer Verschiebung der Umkehrpotentiale bei kleinen  $[Mg^{2+}]_o$  zu positiveren Werten führte. Tatsächlich konnten die Umkehrpotentiale von TRPC5 mit einer  $P_{Mg}/P_{Na}$  von 1,30 und mit Hilfe der Gleichung G3.2a adäquat vorhergesagt werden. Als Wert für  $P_{Cs}/P_{Na}$  diente die im vorangegangenen Abschnitt ermittelte Permeabilität (1,31, siehe oben), und für  $P_{NMDG}/P_{Na}$  wurde ein Wert von 0,05 verwendet, welcher nur geringfügig vom zuvor ermittelten ( $0,08 \pm 0,01$ ) abweicht. Der Permeation von  $Mg^{2+}$  durch TRPC5 liegt somit ebenfalls das Unabhängigkeitsprinzip zugrunde, was bedeutet, dass die ( $Mg^{2+}$ -) Ionen innerhalb der Pore keine oder nur sehr schwache Interaktionen mit dem Kanal und anderen Ionen eingehen. Anders als bei  $Mg^{2+}$  stiegen die Umkehrpotentiale von TRPC5 bei zunehmenden extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen ( $[Ca^{2+}]_o$ ) stärker an ( $60,0 \pm 0,8$  mV pro 10facher Konzentrationsänderung im Bereich zwischen 5 mM und 50 mM, Abb. 3.22C) als nach dem Unabhängigkeitsprinzip zu erwarten wäre. Die geringe Permeabilität von TRPC5 für NMDG<sup>+</sup> ( $P_{NMDG}/P_{Na} = 0,08 \pm 0,01$ ), die bei den verwendeten,  $Ca^{2+}$ -basierten Lösungen (Tab. 3.1) eine Verringerung des Anstieges der Umkehrpotentiale hervorrufen würde, kann demnach in diesem Fall nicht für die Abweichung verantwortlich sein. Folgerichtig waren die mit Gleichung G3.2b ermittelten Permeabilitäten von TRPC5 für  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ) konzentrationsabhängig und stiegen von  $1,93 \pm 0,08$  (5 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ,  $n = 5$ ) auf  $6,14 \pm 0,45$  (50 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,0001$  vgl. 5 mM, Abb. 3.22D) signifikant an. Weil das Unabhängigkeitsprinzip, das eine konzentrationsunabhängige Permeabilitätsratio voraussetzt, ganz offensichtlich für die Permeation von  $Ca^{2+}$  durch TRPC5 nicht erfüllt ist, ist Gleichung G3.2b jedoch streng genommen für diesen Fall nicht anwendbar. Um die Permeabilität von TRPC5 für  $Ca^{2+}$  gegenüber  $Na^+$  exakt zu beschreiben, müsste ein Modell angewendet werden, das die Existenz einer oder mehrerer Bindungsstellen für  $Ca^{2+}$  in der Pore von TRPC5 theoretisch einbezieht. Ein solches Modell (Eyring-Modell) wurde bereits für einige andere Kanäle angewendet. Beim CNG-Kanal aus Stäbchenzellen der Retina wurden z.B. zwei theoretische Bindungsstellen für  $Ca^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  verwendet (Wells & Tanaka, 1997), womit die konzentrationsabhängigen  $P_{Ca}/P_{Na}$  und  $P_{Mg}/P_{Na}$  korrekt vorhergesagt werden konnten. Die Anwendung eines Eyring-Modells beruht neben der Kenntnis der Umkehrpotentiale ( $I = 0$ ) aber vor allem auf der Untersuchung der Leitfähigkeit ( $g$ ) eines Kanals bei verschiedenen Potentialen. Da diese im Fall von TRPC5 jedoch spannungsabhängig sind (siehe Kap. 3.2), und kein direkter Aktivator (wie cGMP bei CNG-Kanälen) bekannt ist, der TRPC5 maximal aktivieren kann (so, dass  $g = g_{max}$ ), wurde von der Anwendung eines Eyring-Modells abgesehen. Für TRPC5 würde ein solches Modell unter den gegebenen Voraussetzungen weniger verlässliche  $P_{Ca}/P_{Na}$ -Werte liefern. Zusammenfassend zeigen die Experimente zum Umkehrpotential, dass die Permeation monovalenter Kationen ( $Na^+$ ,  $Cs^+$ , NMDG<sup>+</sup>) und  $Mg^{2+}$  durch TRPC5

weitgehend konzentrationsunabhängig ist. Die Permeabilität von  $\text{Cs}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  wurde mit  $1,31 \pm 0,01$ , die von  $\text{NMDG}^+$  mit  $0,08 \pm 0,01$ , und die von  $\text{Mg}^{2+}$  mit  $1,30$  determiniert. Die Umkehrpotentiale von TRPC5 bei verschiedenen extrazellulären Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$  verhielten sich hingegen nicht, wie nach dem Unabhängigkeitsprinzip zu erwarten gewesen wäre. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass innerhalb der Pore von TRPC5 mindestens eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$  existiert.

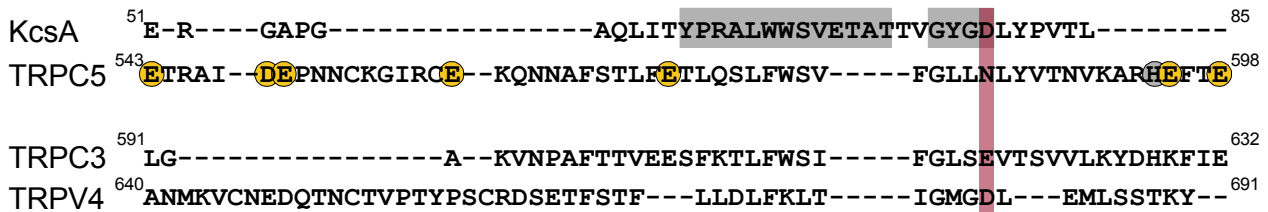
### 3.4.2. Mögliche Determinanten der Ionenpermeation durch TRPC5

#### 3.4.2.1. Mutationen in der Porenregion von TRPC5

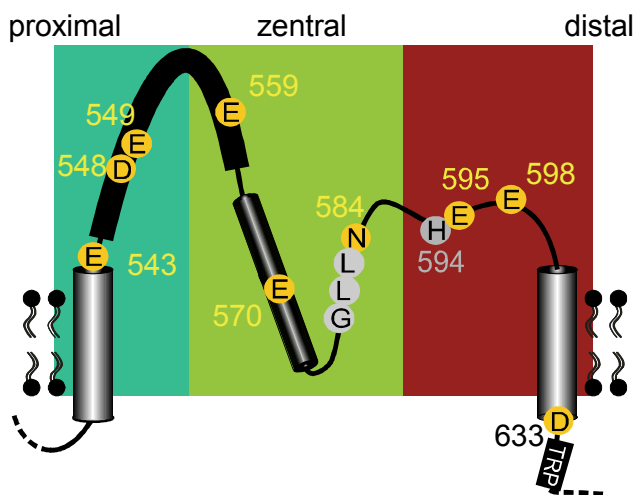
Die Experimente zum Umkehrpotential haben nahe gelegt, dass in der Pore von TRPC5 zumindest eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$  existiert, die bei der Permeation durch den Kanal überwunden werden muss. Die nachfolgend beschriebenen Experimente widmen sich der Suche nach den Aminosäuren, welche an der Ionenbindung in der Pore von TRPC5 beteiligt sind. Selektivitätsfilter für divalente Kationen in der Porenregion von Ionenkanälen werden meist durch die Seitenketten negativ geladener Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) gebildet, da diese aufgrund ihrer negativ geladenen Carboxylatgruppen einen besonders stabilen Bindungspartner für divalente, weniger jedoch für monovalente Kationen darstellen (für ein Review siehe Sather & McCleskey, 2003). Auch bei TRPC5 sind wahrscheinlich die Seitenketten der Glutamat- und Aspartatreste in der mutmaßlichen Porenregion (d.h. zwischen TM5 und TM6) mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung der Bindungsstelle(n) für  $\text{Ca}^{2+}$  und /oder  $\text{Mg}^{2+}$  beteiligt. Die Region in TRPC5 zwischen TM5 und TM6 enthält insgesamt 7 negativ geladene Aminosäuren: E543, D548, E549, E559, E570, E595 sowie E598 (Abb. 3.23A und B). Für die Identifizierung des Selektivitätsfilters wurden diese jeweils durch die Einführung von konservativen Punktmutationen (E→Q, D→N) einzeln neutralisiert. Mit D633, das C-terminal von TM6 lokalisiert ist, wurde ein weiterer negativ geladener Rest untersucht (TRPC5-D633N). Diese Aminosäure spielt eine Rolle beim Block von TRPC5 durch intrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  im Bereich von  $-25$  bis  $+60$  mV (Obukhov & Nowycky, 2005) und könnte somit auf die Ionenpermeation durch TRPC5 ebenfalls Einfluss nehmen. Auch die Seitenketten von Histidinresten könnten Bindungsstellen für positiv geladene Ionen anbieten. In TRPC5 findet sich zwischen TM5 und TM6 genau ein Histidinrest (H594), der gegen ein Leucin (H594L) ausgetauscht wurde. Für die Untersuchung der Bindungsstellen für monovalente Kationen in der Pore von Kanälen sind Mutationsanalysen wenig erfolgversprechend, da solche Stellen meist durch Carbonyl-Sauerstoffatome des Proteinrückgrats ausgebildet werden (Doyle *et al.*, 1998, Sather & McCleskey, 2003). Im Fall von TRPC5 kommt erschwerend hinzu, dass die Permeation

monovalenter Kationen kaum vom Unabhängigkeitsprinzip abweicht und somit die Existenz hochaffiner Bindungsstellen in der Pore eher unwahrscheinlich ist (siehe Kap. 3.4.1). Ein Sequenzvergleich der Porenregion von TRPC5 mit dem  $K^+$ -Kanal aus *Streptomyces lividans* (KcsA), dessen Struktur bereits bekannt ist, erbrachte lediglich geringe Übereinstimmungen (Abb. 3.23A), was im Hinblick auf ihre unter-

A



B



C

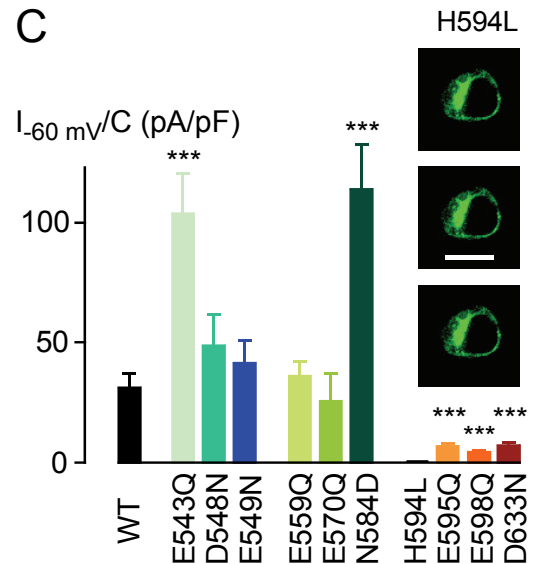


Abbildung 3.23: **Porenmutanten von TRPC5.** A: Sequenzvergleich (ClustalW) von TRPC5 mit KcsA sowie mit TRPC3 und TRPV4 in der mutmaßlichen Porenregion. Man beachte die unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren in TRPC5 (56 AS) und KcsA (28 AS) in dieser Region. Grau hinterlegt sind bei KcsA die Porenhelix und der Bereich des Selektivitätsfilters (GYGD), der gewisse Übereinstimmung mit TRPC5 (GLLN) aufzeigt. In den Aminosäuresequenzen von TRPC3 und TRPV4 finden sich, wie auch in KcsA, negativ geladene Aminosäuren an Stellen analog zu TRPC5-N584 (rot hinterlegt). In der Sequenz von TRPC5 sind alle Aminosäuren, die untersucht wurden, farbig markiert. B: Mögliche Sekundärstruktur von TRPC5 basierend auf der Struktur von und dem Sequenzvergleich mit KcsA. Der besseren Übersicht halber wurde die Porenregion willkürlich in 3 Segmente (proximal, zentral, distal) unterteilt. Die Lage der untersuchten Aminosäuren sind als gelbe oder dunkelgraue (H594) Kreise gekennzeichnet, in hellgrau das GLLN-Motiv (zentral). Der dick und schwarz markierte Bereich in der proximalen und zentralen Region von TRPC5 zeigt den Bereich, der in KcsA fehlt (siehe A). C: Zusammenfassung der maximal gemessenen Stromdichten nach Aktivierung mit  $GTP\gamma S$  in Experimenten mit TRPC5-wt und TRPC5-Mutanten. Die Mutante TRPC5-H594L konnte in 17/17 Experimenten nicht aktiviert werden, war jedoch in der Nähe der Membran lokalisiert, wie Laserscan-Aufnahmen von HEK293-Zellen zeigten, die mit YFP-fusionierter cDNA von TRPC5-H594L transfiziert wurden (*Inset*),

schiedliche Länge (TRPC5: 56 AS, KcsA: 28 AS) nicht überraschte. Auch die Porenregionen anderer Kationenkanäle mit bekannter Röntgenstruktur (KvAP, NaK) sind weniger als 30 Aminosäuren lang (Jiang *et al.*, 2003, Shi *et al.*, 2006, nicht gezeigt). Übereinstimmungen zwischen TRPC5 und KcsA fanden sich trotzdem in einem kleinen Motiv, das den Selektivitätsfilter von KcsA (GYGD, AS 77 bis 80) ausbildet und in TRPC5 als GLLN (AS 581 - 584, Abb. 3.23A) repräsentiert ist. Um zu überprüfen, ob das GLLN-Motiv in TRPC5 ebenfalls in der Nähe des Selektivitätsfilters lokalisiert ist, wurde in der Punktmutante TRPC5-N584D eine zusätzliche Ladung eingeführt und untersucht, ob sich die Permeationseigenschaften dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp veränderten.

Die beschriebenen Punktmutanten von TRPC5 bildeten bis auf eine Ausnahme funktionelle Kanäle, die durch die Infusion von GTP $\gamma$ S über die Patch-Pipette ins

**Tabelle 3.2: Maximale Stromdichten der untersuchten TRPC5-Porenmutanten.** Die Sternchen zeigen signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp an. n.d. = nicht definiert.

Mutante	$I_{-60mV} / C$ [pA/pF]	n
WT	- 31,3 $\pm$ 5,9	11
E543Q	-104,1 $\pm$ 16,7 ***	9
D548N	- 49,0 $\pm$ 13,1	6
E549Q	- 41,7 $\pm$ 9,4	6
E559Q	- 36,3 $\pm$ 6,1	5
E570Q	- 25,7 $\pm$ 11,7	7
N584D	-114,3 $\pm$ 18,6 ***	7
H594L	n.d.	17
E595Q	- 6,9 $\pm$ 1,1 ***	11
E598Q	- 4,5 $\pm$ 0,7 ***	11
D633N	- 7,3 $\pm$ 1,3 ***	9

Cytosol aktiviert werden konnten. Jedoch wurden teilweise deutlich unterschiedliche Stromdichten in Experimenten mit den verschiedenen Mutanten erzielt (Abb. 3.23C und Tab. 3.2). Wie bereits in Kapitel 3.3.4.1 beschrieben, waren die Stromdichten in Experimenten mit TRPC5-E543Q bei einem Haltepotential von -60 mV signifikant größer, und in denen mit TRPC5-E595Q signifikant kleiner als bei TRPC5-wt. Auch mit den TRPC5-Mutanten E598Q, D633N und N584D wurden vom Wildtyp verschiedene Stromdichten beobachtet. Die Einführung der Punktmutation H594L ergab hingegen einen nicht funktionellen Kanal, ein Befund, der auf eine veränderte Tertiärstruktur von TRPC5-H594L, ein defektes *Gating*-Verhalten oder eine gestörte Permeation zurückzuführen sein

könnte. Die Lokalisation in der Zellmembran schien jedoch nicht beeinflusst zu sein, da HEK293-Zellen, die mit der YFP-fusionierten Mutante transfiziert wurden, eine deutliche Fluoreszenz im Membranbereich zeigten (Abb. 3.23C, *Inset*).

### 3.4.2.2. I-V-Beziehungen der Porenmutanten von TRPC5

In Abbildung 3.24 sind die I-V-Beziehungen der untersuchten Porenmutanten zusammengefasst. Die meisten von ihnen (E543Q, D548N, E549Q, E570Q, E595Q, E598Q) unterschieden sich augenscheinlich nicht vom Wildtyp.

Ausnahmen waren jedoch die I-V-Beziehungen von TRPC5-E559Q, bei denen die flache Phase zwischen 0 mV und +60 mV weniger stark ausgeprägt war als bei TRPC5-wt, was auf eine veränderte Ionenpermeation zurückzuführen sein könnte (Abb. 3.24A). Gleiches galt, in Übereinstimmung mit der Literatur, für TRPC5-D633N (Obukhov & Nowycky, 2005). Auch bei der Mutante TRPC5-N584D fiel der Verlauf der I-V-Beziehung ins Auge, der sich deutlich von TRPC5-wt unterschied (Abb. 3.24D). Die fast negative Krümmung der Einwärtsströme sowie die geringere Ausdehnung der flachen Phase der I-V-Beziehungen, die lediglich zwischen ca.

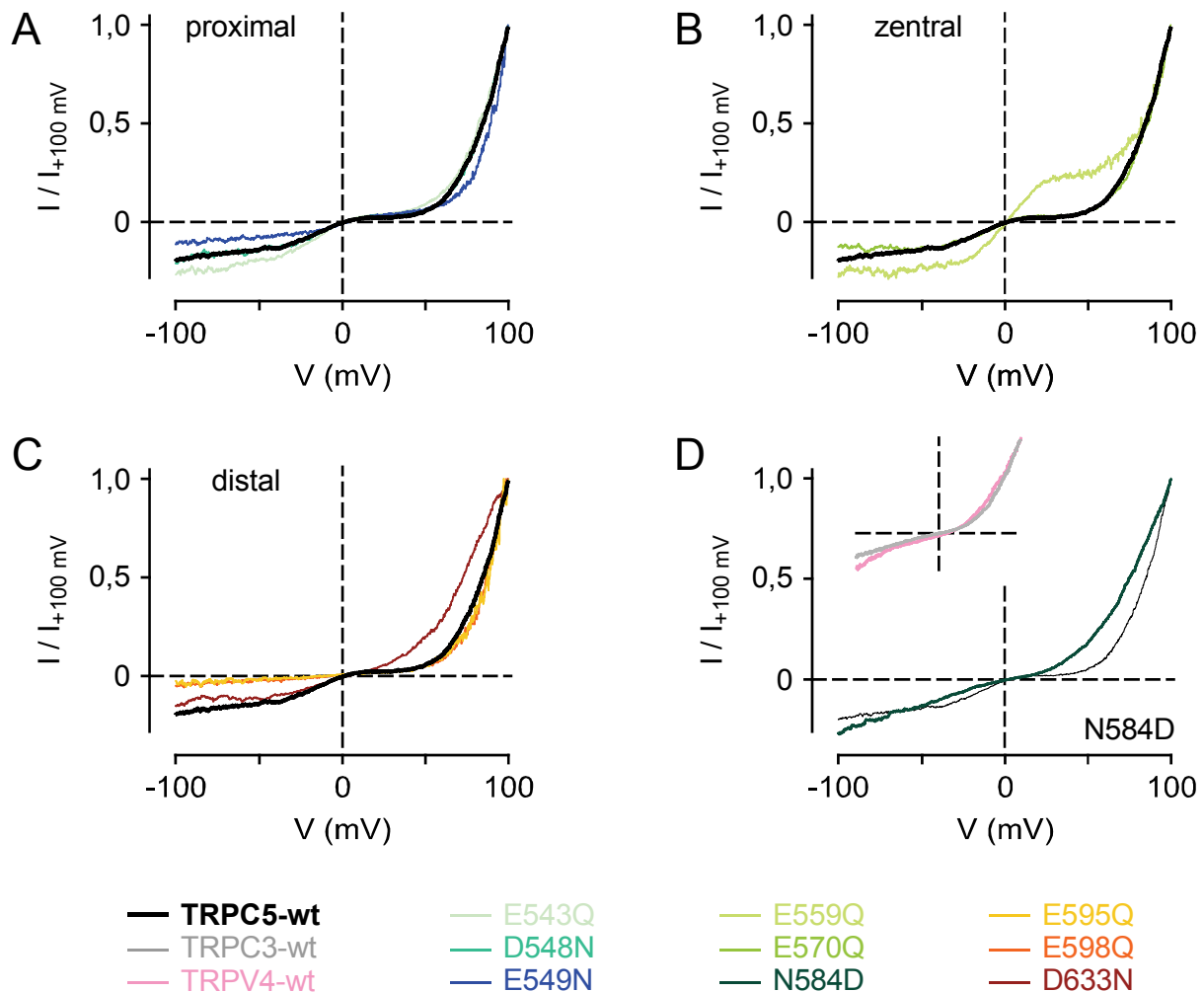


Abbildung 3.24: **I-V-Beziehungen der Porenmutanten von TRPC5.** A bis C: I-V-Beziehungen von TRPC5-wt (jeweils schwarz, dick) sowie von allen untersuchten Mutanten (außer H594L), jeweils auf Ströme bei +100 mV normiert. Die meisten Mutanten hatten ähnliche I-V-Beziehungen wie der Wildtyp, jedoch fiel bei TRPC5-E559Q (B, hellgrün) das weniger flache Segment zwischen -25 mV und +60 mV auf. Die vom Wildtyp verschiedene I-V-Beziehung der Mutante TRPC5-D633N (C, dunkelrot) wurde bereits in Obukhov et al. (2005) beschrieben. D: Die I-V-Beziehung von TRPC5-N584D hatte einen anderen Verlauf als TRPC5-wt und ähnelte eher denen von TRPC3 oder TRPV4 (*Inset*). ) Alle in A und B gezeigten I-V-Beziehungen wurden zum Zeitpunkt der größten Aktivierung durch GTP $\gamma$ S-Infusion (bzw. bei TRPV4 durch extrazelluläre Applikation von 1  $\mu$ M 4 $\alpha$ -PMA) mit Standard-Extra- und Intrazellulärlösungen aufgenommen.



-25 mV und +25 mV zu beobachten war, erinnerten eher an andere TRP-Kanäle wie TRPC3 oder TRPV4 (Abb. 3.24D, *Inset*). Tatsächlich zeigt ein Sequenzvergleich der Porenregionen von TRPC5 mit TRPC3 und TRPV4, dass die letzteren Kanäle jeweils eine negative Ladung an der zu TRPC5-N584 korrespondierenden Position besitzen (TRPC3-E630 und TRPV4-D682, Abb. 3.23A), wobei diese im Falle von TRPV4 bereits als eine Determinante der Ionenpermeation beschrieben worden ist (Voets *et al.*, 2002, Owsianik *et al.*, 2005). Es erscheint somit offensichtlich, dass der Asparaginrest N584 in TRPC5 an einer Position in der Pore lokalisiert sein muss, die eine Beteiligung an Permeationsvorgängen ermöglicht.

### 3.4.3. Permeation divalenter Kationen durch TRPC5

#### 3.4.3.1. Determinanten der $\text{Ca}^{2+}$ -Permeation durch TRPC5

In Übereinstimmung mit den Daten aus Kapitel 3.4.1 hatte TRPC5 mit 150 mM  $\text{Na}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran ein Umkehrpotential knapp unterhalb von 0 mV ( $-0,8 \pm 1,3$  mV,  $n = 9$ ,  $p = 0,6654$ ). Beim Wechsel auf eine Lösung, die nominell nur  $\text{Ca}^{2+}$  (30 mM) und NMDG<sup>+</sup> (90 mM) enthielt, verschob sich dieses

$$\frac{P_{30Y}}{P_{150Na}} = \frac{[Na^+]_o}{4 [Y^{2+}]_o} \exp \frac{F (V_{30Y} - V_{150Na})}{RT} \left( 1 + \exp \frac{F (V_{30Y} - V_{LJ})}{RT} \right) \quad (\text{G3.3})$$

**Gleichung G3.3:**  $P_{30Y}$  und  $P_{150Na}$ : Permeabilitäten von TRPC5 für 30 mM  $Y^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ), bzw. 150 mM  $\text{Na}^+$ .  $[Na^+]_o$  und  $[Y^{2+}]_o$ : extrazelluläre Aktivität an  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  ( $Y^{2+}$ ).  $V_{30Y}$  und  $V_{150Na}$ : Umkehrpotentiale in  $Y^{2+}$  bzw.  $\text{Na}^+$ .  $R, T, F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.  $V_{LJ}$ : *Liquid Junction Potential* (+8,3 mV). Theorie und Herleitung: Kap. 2.4.2.1. Aktivitäten: Kap. 2.4.4.2.

leicht zu hyperpolarisierenden Potentialen auf  $-6,7 \pm 3,7$  mV ( $n = 8$ , Abb. 3.25A), was gemäß Gleichung G3.3 einer Permeabilität von  $P_{30Ca}/P_{150Na} = 3,8 \pm 0,5$  entspricht. Dieser Wert ist zum einen übereinstimmend mit den in Kapitel 3.4.1 ermittelten Permeabilitäten (vgl. Abb. 3.22D). Zum Anderen unterscheidet er sich kaum von der in einer früheren Studie bestimmten  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  ( $1,83 \pm 0,18$ , Jung *et al.*, 2003). Der Wert in dieser Arbeit wurde ebenfalls mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau ermittelt, jedoch fand keine Korrektur des *Liquid Junction Potentials* und der Aktivität der Kationen statt. Ohne diese Korrekturen hätte die hier ermittelte  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  einen Wert von  $1,98 \pm 0,28$ , und wäre übereinstimmend mit der von Jung *et al.* bestimmten Permeabilität. Gleichung G3.3 wurde aus der GHK-Gleichung abgeleitet (siehe Kap. 2.4.2.1) und gibt die Permeabilitäten von TRPC5 für 30 mM  $[Ca^{2+}]_o$  gegenüber 150 mM  $[Na^+]_o$  an, ohne, wie im Fall von Gleichung G3.2b (siehe Kap. 3.4.1), die intrazelluläre Ionenkonzentration und die Permeabilität TRPC5 für NMDG<sup>+</sup> mit einzubeziehen. Es sollte erwähnt werden, dass Gleichung G3.3 aufgrund der Verletzung des Unabhängigkeitsprinzips streng

genommen nicht für die Permeation von  $\text{Ca}^{2+}$  durch TRPC5 angewendet werden dürfte. Sie kann daher hier nur Vergleichswerte für  $P_{30\text{Ca}}/P_{150\text{Na}}$  zwischen TRPC5-wt und -Mutanten liefern, jedoch keine allgemeingültigen Werte.

Die Umkehrpotentiale der in Kapitel 3.4.2.1 und 3.4.2.2 beschriebenen Punktmutanten in 30 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  und 150 mM  $[\text{Na}^+]$  sowie die  $P_{30\text{Ca}}/P_{150\text{Na}}$ -Werte sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Die Mutanten TRPC5-E549Q (Abb. 3.25B), -E559Q (Abb. 3.25C) und -E570Q (Abb. 3.25D) wiesen dabei signifikant negativere Umkehrpotentiale in 30 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  auf als TRPC5-wt, während ihre Umkehrpotentiale in 150 mM  $\text{Na}^+$  nahezu unverändert blieben. Bemerkenswert waren insbesondere die Ströme durch TRPC5-E559Q, bei denen sich das Umkehr-

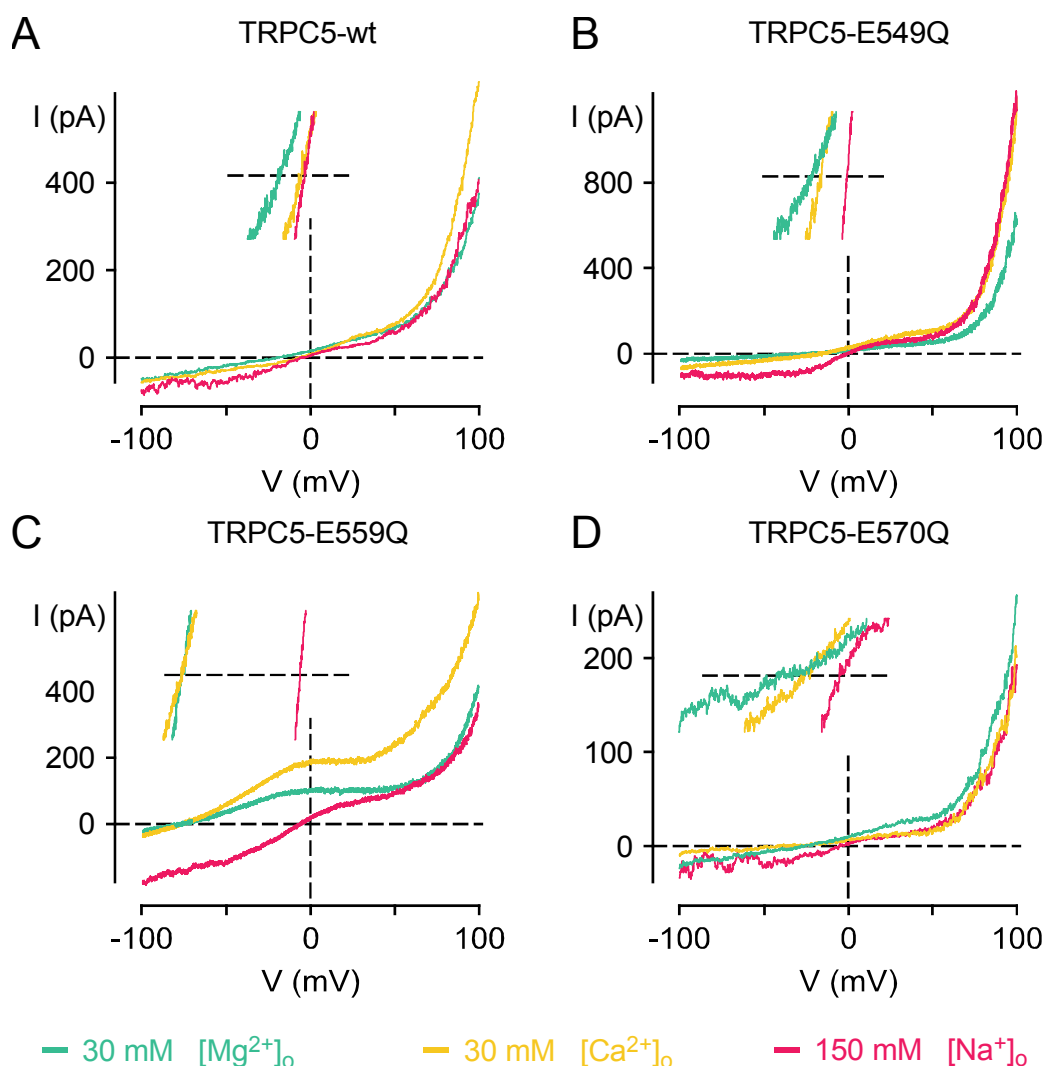


Abbildung 3.25: **Umkehrpotentiale von TRPC5 und den Einzelmutanten E549Q, E559Q, E570Q in  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -basierten, extrazellulären Lösungen.** A bis D: I-V-Beziehungen von TRPC5-wt (A), TRPC5-E549Q (B), TRPC5-E559Q (C) und TRPC5-E570Q (D) mit 30 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (blau), 30 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (gelb) oder 150 mM  $\text{Na}^+$  (rot) auf der extrazellulären Seite der Membran. *Inset*, Der Ausschnitt der Ströme zwischen -10 pA und +10 pA verdeutlicht die Lage der Umkehrpotentiale. Die Spannungsachsen der *Insets* sind im Vergleich zu den großen Graphen jeweils nicht verschoben.

potential in 30 mM  $[Ca^{2+}]_o$  so weit zu negativen Potentialen verschob, dass kaum noch Einwärtsströme messbar waren (Abb. 3.25C). Die durchschnittliche Stromdichte betrug unter diesen Bedingungen z.B. bei -100 mV lediglich  $-3,9 \pm 1,5$  pA/pF ( $n = 5$ ), und beim Haltepotential (-60 mV) wurden in 3/5 Experimenten Ströme mit positivem Vorzeichen, mit hoher Wahrscheinlichkeit  $Cs^+$ -Auswärtsströme durch TRPC5-E559Q, gemessen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Neutralisation der Reste E549, E559 und E570 zu einer schwächeren Bindung von  $Ca^{2+}$  an TRPC5 führt, während die Permeation von  $Na^+$  kaum beeinflusst wird. Die mit Gleichung G3.3 berechneten  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  fielen für TRPC5-E549Q, TRPC5-E559Q und TRPC5-E570Q entsprechend niedriger aus als beim

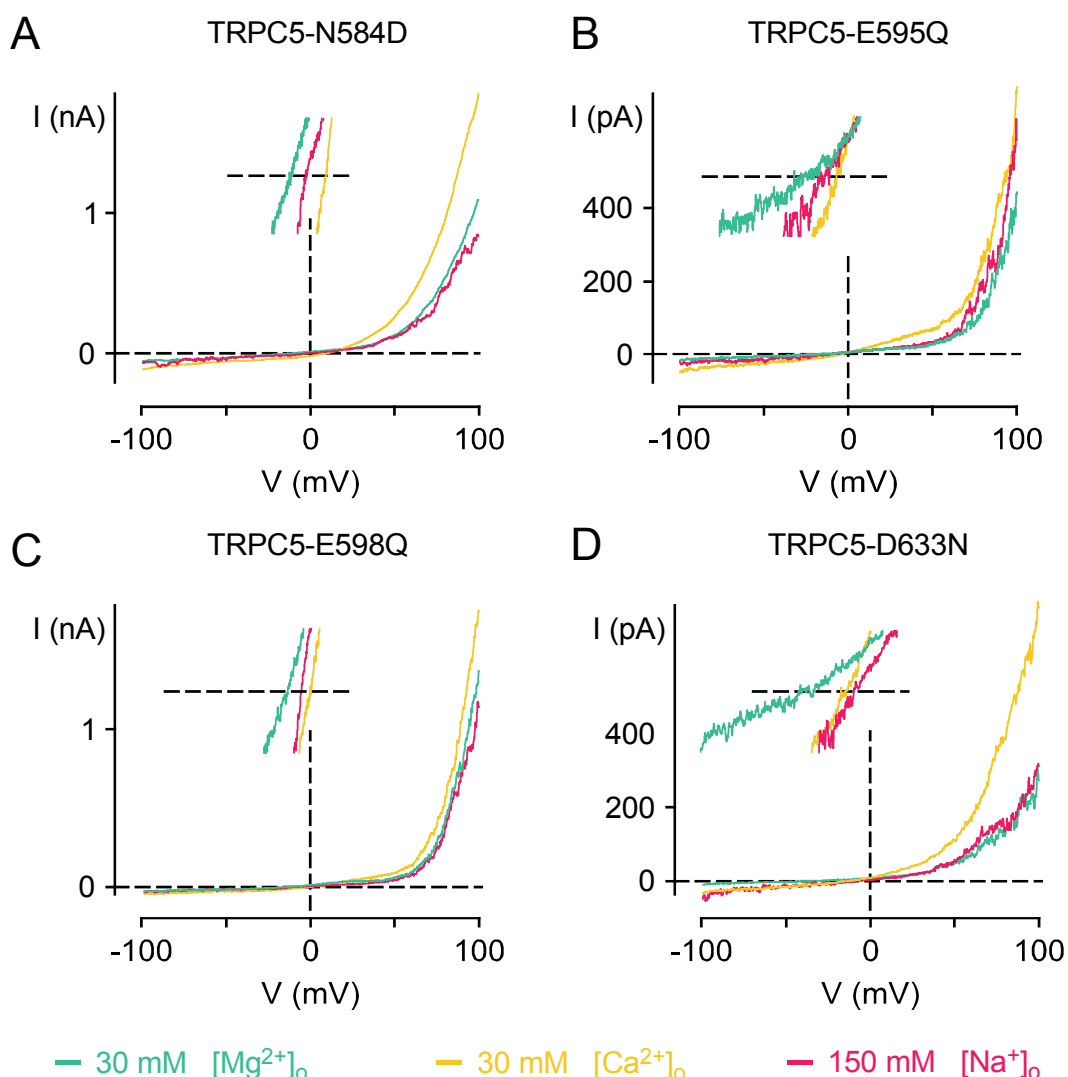


Abbildung 3.26: **Umkehrpotentiale der TRPC5-Einzelmutanten N584D, E595Q, E598Q und D633N in  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -basierten, extrazellulären Lösungen.** A bis D: I-V-Beziehungen von TRPC5-N584D (A), TRPC5-E595Q (B), TRPC5-E598Q (C) und TRPC5-D633N (D) mit 150 mM  $Na^+$  (rot), 30 mM  $Mg^{2+}$  (blau) oder 30 mM  $Ca^{2+}$  (gelb) auf der extrazellulären Seite der Membran. *Inset*, Der Ausschnitt der Ströme zwischen -10 pA und +10 pA verdeutlicht die Lage der Umkehrpotentiale. Die Spannungsschichten der *Insets* sind im Vergleich zu den großen Graphen jeweils nicht verschoben.

Wildtyp (Tab. 3.3 und Abb. 3.27). Die Neutralisierung der Aminosäuren E543 und D548, die in der Nähe von TM5 lokalisiert sind, veränderte hingegen die Werte für  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  nicht signifikant (Tab. 3.3, Daten nicht gezeigt). Auffallend waren hierbei lediglich die im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhten Umkehrpotentiale von TRPC5-E543Q in 150 mM  $[Na^+]_o$  ( $+3,5 \pm 1,1$  mV). Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf den höheren Stromdichten bei E543Q (siehe Kap. 3.4.2.2), die insgesamt zu geringeren Kontaminationen durch Leck- und/oder endogene Ströme als beim Wildtyp führten. Im Gegensatz dazu waren die  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  der Einzelmutanten TRPC5-E595Q (Abb. 3.26B) und TRPC5-E598Q (Abb. 3.26C) signifikant größer als bei TRPC5-wt. Bereits in einer früheren Studie wurde für die Doppel-

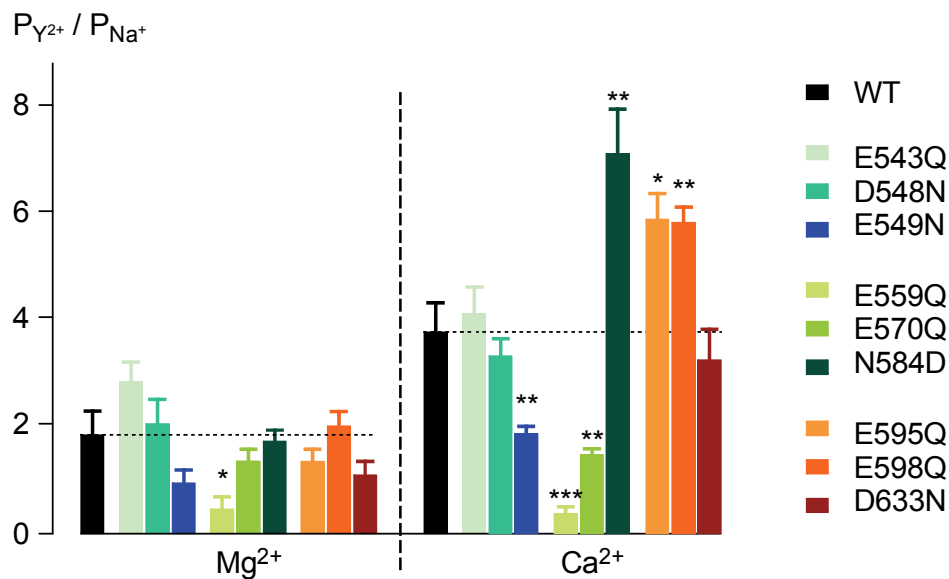


Abbildung 3.27: **Zusammenfassung der Permeabilitäten von TRPC5 und den Poremutanten für Mg<sup>2+</sup> (30 mM) und Ca<sup>2+</sup> (30 mM) gegenüber Na<sup>+</sup> (150 mM).** Mit Gleichung G3.3 ermittelte  $P_{30Mg}/P_{150Na}$  und  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  -Mittelwerte von TRPC5-wt und den untersuchten Poremutanten.

mutante TRPC5-E595Q/E598Q eine erhöhte Permeabilität von Ca<sup>2+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> ermittelt ( $4,28 \pm 0,18$ , Jung *et al.*, 2003), weshalb dieses Ergebnis wenig überraschte. Jedoch kam die Erhöhung der relativen Permeabilitäten für Ca<sup>2+</sup> bei den TRPC5-Einzelmutanten E595Q und E598Q aufgrund zweier verschiedener Effekte zustande. Zum einen kehrten die I-V-Beziehungen beider Mutanten in 30 mM  $[Ca^{2+}]_o$  bei stärker depolarisierenden Potentialen um als der Wildtyp, was für eine erhöhte Permeabilität für Ca<sup>2+</sup> spricht. Dieser Unterschied war jedoch in beiden Fällen nicht signifikant (E595Q:  $p = 0,3485$ , E598Q:  $p = 0,1949$ , siehe Tab. 3.3). Zum anderen wiesen sowohl TRPC5-E595Q ( $p = 0,0004$ ) als auch TRPC5-E598Q ( $p = 0,0333$ ) signifikant negativere Umkehrpotentiale in 150 mM  $[Na^+]_o$  auf als TRPC5-wt (Tab. 3.3). Dies könnte auf eine geringere Permeabilität der Mutanten für Na<sup>+</sup> (gegenüber Cs<sup>+</sup> im Cytosol) hindeuten, jedoch auch ein Effekt von endogenen Strömen oder Leckströmen sein, die bei den extrem kleinen Einwärts-

strömen durch diese Mutanten (Abb. 3.26B und C, siehe auch Kap. 3.4.2.1) an Einfluss gewannen. Somit wäre es möglich, dass die Permeabilitäten von TRPC5-E595Q und -E598Q für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Na}^+$  tatsächlich nicht signifikant vom Wildtyp verschieden sind, und die bereits beschriebene, größere  $P_{30\text{Ca}}/P_{150\text{Na}}$  der Doppelmutante TRPC5-E595Q/E598Q (Jung et al., 2003) aus einem Kombinationseffekt beider Mutationen resultiert. Bei der Mutante TRPC5-D633N waren sowohl die Umkehrpotentiale in 150 mM  $[\text{Na}^+]_o$  ( $p = 0,0004$ , Abb. 3.26D) als auch die Einwärtsströme (Tab 3.2) signifikant kleiner als bei TRPC5-wt. Da dieser Kanal auch in 30 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  bei geringeren Potentialen umkehrte ( $p = 0,0341$  vgl. TRPC5-wt), unterschied sich seine  $P_{30\text{Ca}}/P_{150\text{Na}}$  jedoch nicht signifikant von der des Wildtyps ( $p = 0,3659$ , Abb. 3.27 und Tab. 3.3). Die Einführung einer negativen Ladung in die Region zwischen TM5 und TM6 (N584D) hingegen erhöhte die Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  signifikant ( $p = 0,005$ , Tab. 3.3). Dabei kehrte der Strom durch TRPC5-N584D in 150 mM  $[\text{Na}^+]_o$  bei ähnlichen Potentialen wie der Wildtyp um ( $p = 0,9602$ , Abb. 3.26A und Tab. 3.3), hatte in 30 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  jedoch signifikant positivere Umkehrpotentiale ( $p = 0,0069$ ). Dies deutet darauf hin, dass mit der Mutation N584D die Affinität von TRPC5 für  $\text{Ca}^{2+}$ , jedoch nicht für  $\text{Na}^+$  erhöht wird. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass TRPC5-E549Q, TRPC5-E559Q und TRPC5-E570Q eine deutlich geringere Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen als der Wildtyp. Damit sind die neutralisierten Aminosäuren in diesen Mutanten mögliche Bindungsstellen von  $\text{Ca}^{2+}$  an TRPC5. Die Einführung einer negativen Ladung am Rest N584 erhöhte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität von TRPC5, was auf eine räumliche Nähe auch dieser Aminosäure zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivitätsfilter hinweist. Im Hinblick auf ihre deutlich kleineren Ströme und der erhöhten Permeabilität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Na}^+$  zeigten auch die Reste E595 und E598 deutliche Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Letzteres könnte jedoch durch fehlerbehaftete Umkehrpotentiale in  $\text{Na}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen zustande gekommen sein, weshalb eine Beteiligung von E595 und E598 an der Ionenpermeation durch TRPC5 zu diesem Zeitpunkt noch fraglich bleibt.

### **3.4.3.2. Die Permeation von $\text{Mg}^{2+}$ durch TRPC5**

Die in Kapitel 3.4.3.1 gezeigten Experimente wurden auch für  $\text{Mg}^{2+}$  durchgeführt, das wie  $\text{Ca}^{2+}$  in einer Konzentration von  $[\text{Mg}^{2+}]_o = 30$  mM von der extrazellulären Seite der Membran appliziert wurde. In solchen Lösungen hatte TRPC5-wt ein Umkehrpotential von  $-22,2 \pm 6,0$  mV ( $n = 7$ , Abb. 3.25A), was, übereinstimmend mit den Daten aus Kapitel 3.4.1, einer  $P_{30\text{Mg}}/P_{150\text{Na}}$  von  $1,8 \pm 0,4$  (Gleichung G3.3) entsprach. Mit einer Ausnahme unterschieden sich die relativen Permeabilitäten der bereits in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Punktmutanten für  $\text{Mg}^{2+}$  nicht signifikant von der des Wildtyps, jedoch schwankten die Mittelwerte der  $P_{30\text{Mg}}/P_{150\text{Na}}$  teilweise beträchtlich zwischen Werten von 0,9 und 2,8 (Tab. 3.3). Die starke

Streuung der Werte kann ebenso wie bei den Experimenten in 30 mM  $[Ca^{2+}]_o$  durch die extrem kleinen Einwärtsströme erklärt werden, die in  $Mg^{2+}$ -basierten Extrazellulärlösungen noch kleiner waren als in 30 mM  $Ca^{2+}$ , und sowohl den Ablesefehler als auch den Einfluss von Kontaminationen begünstigten. Signifikant verändert waren lediglich die  $P_{30Mg}/P_{150Na}$  der Mutante TRPC5-E559Q (Tab. 3.3 und Abb. 3.25C), die mit durchschnittlich  $0,4 \pm 0,2$  ( $n = 4$ ,  $p = 0,0174$ ) stark reduziert waren. Da auch die  $P_{30Ca}/P_{150Na}$ -Werte dieser Mutante signifikant kleiner als beim Wildtyp waren (siehe Kap. 3.4.2.1), deutet dies darauf hin, dass der Glutamatrest E559 eine Schlüsselrolle bei der Permeation divalenter Kationen durch TRPC5 einzunehmen scheint. Dieses Ergebnis überraschte in Anbetracht der Tatsache, dass durch die Experimente zum Umkehrpotential (siehe Kap. 3.4.1) eine unabhängige Permeation von  $Mg^{2+}$  durch TRPC5 vorausgesagt wurde. Folglich müsste die Permeabilität für  $Mg^{2+}$ , im Gegensatz zu  $Ca^{2+}$ , von den hier eingeführten

Tabelle 3.3: **Relative Permeabilitäten  $P_{30Ca}/P_{150Na}$  und  $P_{30Mg}/P_{150Na}$  von TRPC5 und Mutanten sowie Umkehrpotentiale in 150 mM  $Na^+$  ( $V_{rev,Na}$ ), 30 mM  $Ca^{2+}$  ( $V_{rev,Ca}$ ) und 30 mM  $Mg^{2+}$  ( $V_{rev,Mg}$ ).** Die Sternchen zeigen signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp an.

Mutante	$V_{rev,Na}$ [mV]	$V_{rev,Mg}$ [mV]	$P_{30Mg}/P_{150Na}$	n	$V_{rev,Ca}$ [mV]	$P_{30Ca}/P_{150Na}$	n
WT	- 0,8 ± 1,3	- 22,2 ± 6,0	1,8 ± 0,4	7	- 6,7 ± 2,9	3,8 ± 0,5	8
E543Q	+ 3,5 ± 1,1 *	- 5,2 ± 1,4	2,8 ± 0,3	4	- 0,1 ± 1,6	4,1 ± 0,5	5
D548N	- 4,4 ± 1,0	- 21,1 ± 7,1	2,0 ± 0,4	5	-10,4 ± 1,5	3,2 ± 0,3	6
E549Q	- 3,6 ± 1,8	- 35,2 ± 4,9	0,9 ± 0,2	5	-20,8 ± 1,4 **	1,8 ± 0,1 **	6
E559Q	- 4,4 ± 0,5	- 58,5 ± 9,7 **	0,4 ± 0,2 *	4	-63,9 ± 5,8***	0,3 ± 0,1***	5
E570Q	- 1,4 ± 1,3	- 23,9 ± 4,2	1,3 ± 0,2	3	-24,8 ± 0,7***	1,4 ± 0,1 **	6
N584D	- 0,9 ± 1,3	-18,2 ± 2,5	1,7 ± 0,2	6	+ 5,8 ± 2,6 **	7,1 ± 0,8 **	7
H594L	-	-	-	-	-	-	-
E595Q	-10,0 ± 1,6***	- 31,5 ± 2,8	1,3 ± 0,2	6	- 3,5 ± 1,1	5,9 ± 0,5 *	7
E598Q	- 6,4 ± 1,6 **	- 19,3 ± 4,0	2,0 ± 0,2	4	- 0,7 ± 2,0	5,8 ± 0,3 **	4
D633N	-11,3 ± 1,9***	- 38,3 ± 4,6	1,1 ± 0,2	5	-16,6 ± 2,3 *	3,2 ± 0,5	5

Mutationen weitestgehend unberührt bleiben. Aufgrund seiner wahrscheinlichen Position im äußeren Vestibül könnte der Glutamatrest E559 somit eine Bindungsstelle für divalente Kationen ausbilden, die etwas abseits vom Selektivitätsfilter liegt (siehe Diskussion, Kapitel 4.3). TRPC5-E549Q und -E570Q (Abb. 3.25B und D), welche wie TRPC5-E559Q eine signifikant niedrigere  $Ca^{2+}$ -Permeabilität aufwiesen, hatten auch verringerte Werte für  $P_{30Mg}/P_{150Na}$ , die sich jedoch nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden (E549Q:  $p = 0,0911$ , E570Q:  $p = 0,3267$ , Tab. 3.3). Bei der Mutante TRPC5-N584D, die im Vergleich zu TRPC5-wt eine signifikant erhöhte

Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität aufwies (siehe Kap. 3.4.2.1), war die  $P_{30\text{Mg}}/P_{150\text{Na}}$  im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert ( $p = 0,8190$ , Tab. 3.3 und Abb. 3.26A). Auch die Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q kehrten in 30 mM [Mg]<sub>o</sub> bei ähnlichen Potentialen wie der Wildtyp um (E595Q:  $p = 0,2122$ , E598Q:  $p = 0,7424$ , Tab. 3.3 sowie Abb. 3.26B und C) um. Damit änderte die Neutralisation der nahe TM6 lokalisierten Glutamatreste E595 und E598 jeweils wenig an der relativen Permeabilität von TRPC5 für Mg<sup>2+</sup>. Die Mutation des Aspartatrestes D633 hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Permeabilität von Mg<sup>2+</sup> für TRPC5 ( $p = 0,1633$ , Tab. 3.3 und Abb. 3.26D). Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäure D633 trotz ihrer Rolle beim Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Block von TRPC5 keine geschwindigkeitsbestimmende Komponente des Permeationswegs von Mg<sup>2+</sup> (und auch Ca<sup>2+</sup>) durch TRPC5 darstellt.

#### 3.4.4. Permeation monovalenter Kationen durch TRPC5

Die bisher vorgestellten Daten haben gezeigt, dass die Permeation von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> durch TRPC5 mit der Neutralisation des Glutamatrestes E559 stark inhibiert wird. Es sollte nun untersucht werden, ob die Permeation monovalenter Kationen durch die Neutralisation einer negativen Seitenkette zwischen TM5 und TM6 verändert werden kann. Der generelle Versuchsaufbau unterschied sich dabei nicht von den in Kapitel 3.4.3 gezeigten Experimenten. Der Vorteil bei Versuchen, die die Berechnung der Permeabilität monovalenter Kationen (X<sup>+</sup>) gegenüber Na<sup>+</sup> zum Ziel haben, liegt jedoch darin, dass lediglich die Verschiebung des Umkehrpotentials ( $\Delta V_{\text{rev}}$ ) beim Wechsel einer Na<sup>+</sup>-basierten Extrazellulärlösung auf eine Lösung, die das Kation X<sup>+</sup> enthält, ermittelt werden muss, wie Gleichung G3.4 verdeutlicht. Dadurch war es möglich, in den nachfolgend beschriebenen Versuchen externe

$$\frac{P_X}{P_{\text{Na}}} = \frac{[\text{Na}^+]_o}{[\text{X}^+]_o} \exp \frac{F(V_X - V_{\text{Na}})}{RT} \quad (\text{G3.4})$$

**Gleichung G3.4:**  $P_X$  und  $P_{\text{Na}}$ : Permeabilitäten von TRPC5 für X<sup>+</sup> (Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, oder Cs<sup>+</sup>), bzw. Na<sup>+</sup>.  $[\text{Na}^+]_o$  und  $[\text{X}^+]_o$ : extrazelluläre Konzentrationen an Na<sup>+</sup> (140 mM) bzw. X<sup>+</sup> (ebenfalls 140 mM, daher entfällt der erste Term der Gleichung).  $V_X$  und  $V_{\text{Na}}$ : Umkehrpotentiale in extrazellulärem X<sup>+</sup> bzw. Na<sup>+</sup>.  $R, T, F$ : universelle Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante. Theorie und Herleitung, siehe Kap. 2.4.2.1.

Lösungen zu verwenden, die außer dem zu untersuchenden Kation X<sup>+</sup> (jeweils 140 mM) in Anlehnung an die Standard-Lösung zusätzlich Cs<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> sowie Mg<sup>2+</sup> enthielt (siehe Kap. 2.4.4.1.). Dies wirkte sich außerordentlich positiv auf die Stabilität der Zellen und Qualität der Messungen aus.

### 3.4.4.1. Effekte von Alkalimetall-Ionen auf Ströme durch TRPC5-wt

#### 3.4.4.1.1. Ganzzellströme durch TRPC5-wt

Die Ganzzellströme durch TRPC5 hatten, wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, mit 140 mM Na<sup>+</sup> auf der extrazellulären Seite der Membran eine charakteristische, doppelt-rektifizierende I-V-Beziehung mit einem Umkehrpotential in der Nähe von 0 mV ( $+4,4 \pm 0,7$  mV, n = 25). Der Austausch des extrazellulären Na<sup>+</sup> gegen Cs<sup>+</sup> (140 mM) führte zu einer Verschiebung der Umkehrpotentiale zu depolarisierenden Potentialen (um  $+4,6 \pm 1,0$  mV, n = 13, Abb. 3.28). Dies entsprach gemäß Gleichung G3.4 einer Permeabilität von Cs<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup>

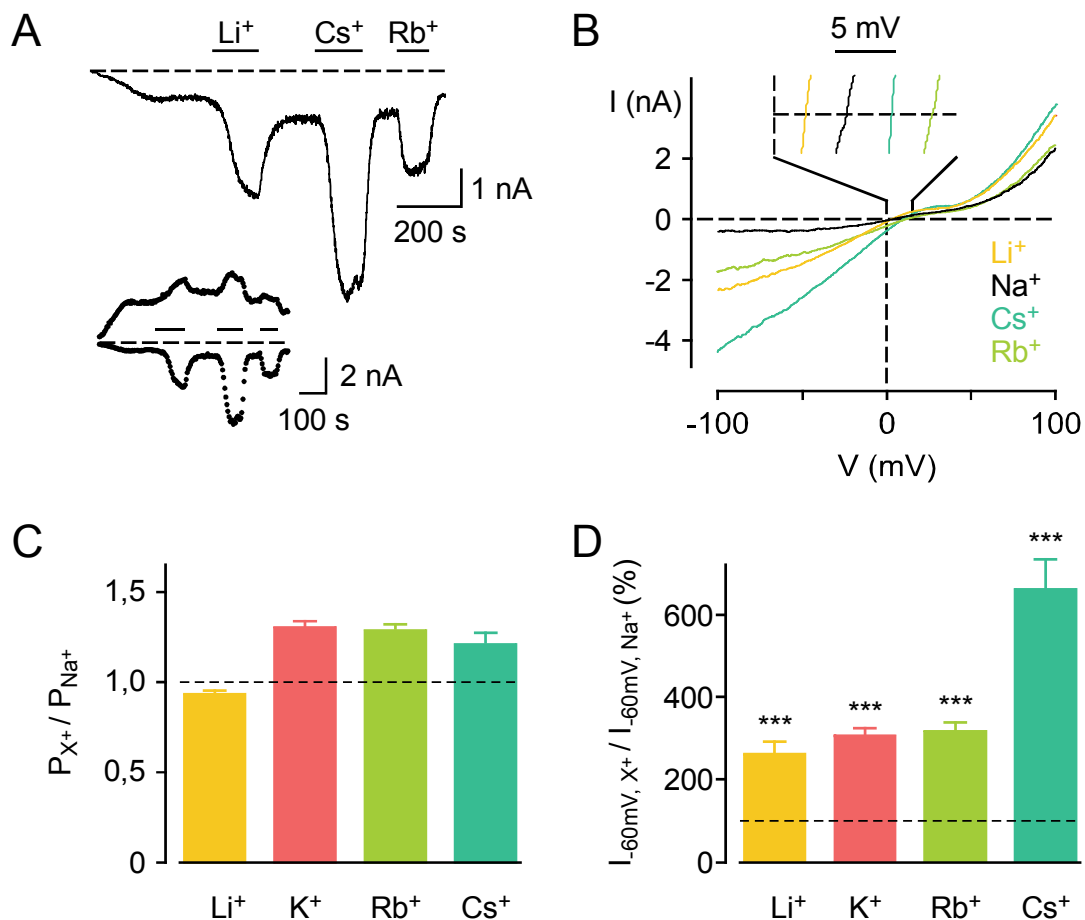


Abbildung 3.28: **Effekte von Alkalimetall-Ionen auf Ganzzellströme durch TRPC5.**

A: Zeitverlauf von TRPC5, aktiviert durch GTP $\gamma$ S-Infusion ins Cytosol bei -60 mV mit jeweils 140 mM Li<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> oder Rb<sup>+</sup> (schwarze Balken) bzw. Na<sup>+</sup> auf der extrazellulären Seite der Membran. *Inset*, Zeitverlauf des gleichen Experiments bei  $\pm 100$  mV. Die Einwärts- und Auswärtsströme durch TRPC5 werden durch Li<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> und Rb<sup>+</sup> deutlich potenziert. B: I-V-Beziehungen von TRPC5 in 140 mM extrazellulärem Na<sup>+</sup> (schwarz), Li<sup>+</sup> (gelb), Cs<sup>+</sup> (blau) und Rb<sup>+</sup> (grün) aus dem in A gezeigten Experiment. *Inset*, Der Ausschnitt der Ströme zwischen -10 pA und +10 pA verdeutlicht die Lage der Umkehrpotentiale in den verschiedenen extrazellulären Lösungen. Die Spannungsachse wurde aus Gründen der besseren Übersicht expandiert. C: Zusammenfassung der relativen Permeabilitäten der Alkalimetall-Ionen gegenüber Na<sup>+</sup> aus n = 13-19 Experimenten mit TRPC5-wt. D: Zusammenfassung der Potenzierung der Ströme durch TRPC5-wt bei -60 mV in extrazellulären Lösungen mit verschiedenen Alkalimetall-Ionen (n = 13-19).



( $P_{\text{Cs}}/P_{\text{Na}}$ ) von  $1,21 \pm 0,05$  und war übereinstimmend mit dem in Kapitel 3.4.1 ermittelten Wert ( $1,31 \pm 0,08$ ), der mit nominell  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien, extrazellulären Lösungen bei verschiedenen  $\text{Cs}^+$ -Konzentrationen determiniert wurde. Entsprechend der relativ kleinen Verschiebungen der Umkehrpotentiale beim Wechsel zu anderen Alkalimetall-Ionen lagen die relativen Permeabilitäten von  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  in der Nähe von 1 (Tab. 3.4), gleichbedeutend mit einer sehr schwachen Selektivität von TRPC5 für monovalente Kationen. Die Mittelwerte der relativen Permeabilitäten der Alkalimetall-Ionen folgten der Sequenz  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+$ , was der Reihe IV nach Eisenman (1962) und damit einem Selektivitätsfilter mit relativ schwacher Feldstärke entspricht (Abb. 3.28C).

Ein interessanter Begleiteffekt beim Wechsel von  $\text{Na}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen zu Lösungen mit anderen Alkalimetall-Ionen war die Potenzierung der  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktivierten Ströme durch TRPC5-wt (Abb. 3.28A und D). In extrazellulären Lösungen mit 140 mM  $\text{Na}^+$  betrug die mittlere Stromdichte  $-36,4 \pm 7,0$  pA/pF (-60 mV,  $n = 19$ ). Die Amplituden stiegen in 140 mM  $\text{Li}^+$  auf  $261 \pm 30\%$  dieses

Tabelle 3.4: **Relative Permeabilitäten von TRPC5 für Alkalimetall-Ionen.**  $\Delta E_{\text{rev}}$ : Verschiebung der Umkehrpotentiale beim Wechsel von  $\text{Na}^+$ -basierten, extrazellulären Lösungen auf solche mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$ .

$\text{X}^+$	$\Delta E_{\text{rev}}$ (mV)	$P_{\text{X}} / P_{\text{Na}}$	n
$\text{Li}^+$	$-1,8 \pm 0,5$	$0,93 \pm 0,02$	13
$\text{Na}^+$	0	1	-
$\text{K}^+$	$+6,7 \pm 0,7$	$1,31 \pm 0,03$	19
$\text{Rb}^+$	$+6,4 \pm 0,5$	$1,29 \pm 0,03$	19
$\text{Cs}^+$	$+4,6 \pm 1,0$	$1,21 \pm 0,05$	13

Werts (-60 mV,  $n = 14$ ,  $p < 0,001$  vgl.  $\text{Na}^+$ ) und damit ähnlich stark wie bei der Reduktion des extrazellulären pH-Werts auf pH 6,5 (siehe Kap. 3.3.2.1). Die Potenzierungen beim Wechsel von  $\text{Na}^+$  auf  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  fielen mit  $307 \pm 17\%$  ( $n = 17$ ),  $317 \pm 22\%$  ( $n = 17$ ) bzw.  $662 \pm 76\%$  ( $n = 14$ ,  $p < 0,001$  in allen Fällen) sogar noch größer aus als in  $\text{Li}^+$ . Es ist unwahrscheinlich, dass die Potenzierung von TRPC5 allein durch

die Verschiebungen der Umkehrpotentiale beim Wechsel von  $\text{Na}^+$  auf  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  hervorgerufen werden, da diese im Verhältnis zum Ausmaß der Potenzierung nur sehr geringfügig waren. Außerdem waren die Umkehrpotentiale mit  $\text{Li}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran kleiner als in  $\text{Na}^+$  und würden somit eher eine Verringerung der Amplituden der Einwärtsströme hervorrufen.

#### 3.4.4.1.2. Einzelkanalströme durch TRPC5-wt

Um zu überprüfen, durch welche Effekte Alkalimetall-Ionen die Potenzierung der Ströme durch TRPC5 hervorrufen, wurden bei ähnlichem Versuchsaufbau die Einzelkanalströme im *Outside-Out*-Modus untersucht (Abb. 3.29). In Übereinstimmung mit den Daten aus früheren Studien und den Daten aus Kapitel 3.2.3 hatten die Einzelkanalströme durch TRPC5 mit 140 mM  $\text{Na}^+$  in der Extrazellulärlösung bei

-60 mV eine basale Offenwahrscheinlichkeit von  $0,08 \pm 0,05$  ( $n = 9$ ) und eine Amplitude von  $-2,49 \pm 0,08$  pA ( $n = 9$ , Abb. 3.29A und B), was gemäß Gleichung G3.5 einer Einzelkanalleitfähigkeit bei -60 mV von  $38,9 \pm 1,2$  pS in  $\text{Na}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen entsprach (Abb. 3.29B). Mit  $\text{K}^+$  ( $p = 0,014$ ),  $\text{Rb}^+$  ( $p = 0,0136$ ) oder  $\text{Cs}^+$  ( $p = 0,0012$ ) hatte TRPC5 jeweils eine signifikant größere Einzelkanalamplitude als in  $\text{Na}^+$  (Tab. 3.5). Die entsprechende Einzelkanalleitfähigkeit war jedoch nur leicht, im Fall von  $\text{Rb}^+$  nicht einmal signifikant, erhöht als mit

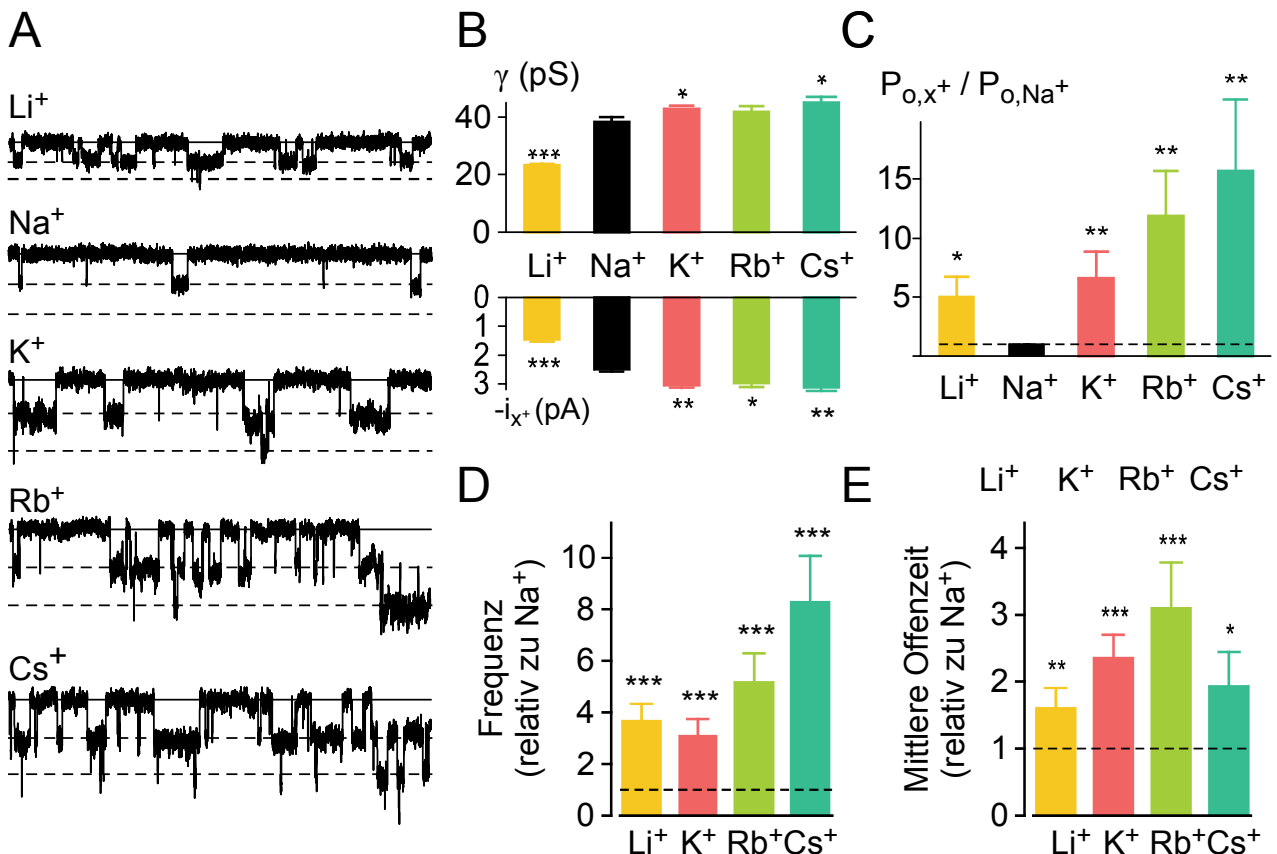


Abbildung 3.29: **Effekte von Alkalimetall-Ionen auf den Einzelkanalstrom durch TRPC5.** A: Einzelkanalspuren (*Outside-Out*) von TRPC5 bei -60 mV mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran (jeweils 140 mM). Die durchgezogenen Linien markieren den geschlossenen Zustand von TRPC5, die gestrichelten Linien die offenen Zustände. B: Einzelkanalamplitude ( $i$ ) und Einzelkanalleitfähigkeit ( $\gamma$ ) von TRPC5 in extrazellulären Lösungen mit den verschiedenen Alkalimetall-Ionen aus  $n = 3-8$  Experimenten. Während die Amplitude entweder signifikant größer ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) bzw. kleiner ( $\text{Li}^+$ ) als in  $\text{Na}^+$  war (siehe A), unterschied sich die Leitfähigkeit von TRPC5 nur in  $\text{Li}^+$  deutlich von denen in  $\text{Na}^+$ . C-E: Zusammenfassung der Offenwahrscheinlichkeit (C), der Anzahl an Öffnungen pro Sekunde (Frequenz, D) sowie der mittleren Offenzeit (E) von TRPC5 in  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen relativ zu den Werten in  $\text{Na}^+$  ( $n = 3-7$ ).

$\text{Na}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran. Dies zeigt, dass die Erhöhung der Einzelkanalamplituden in  $\text{K}^+$ -,  $\text{Rb}^+$ - bzw.  $\text{Cs}^+$ -basierten Lösungen zum großen Teil auf die positiveren Umkehrpotentiale von TRPC5 (ermittelt im *Whole-Cell*-Modus, siehe oben) und der damit verbundenen höheren elektrischen Triebkraft der Ströme

bei -60 mV zurückzuführen ist. Der Austausch des extrazellulären  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$  führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Einzelkanalamplitude von TRPC5 ( $p = 0,0001$ , Tab. 3.5). Da auch die Einzelkanalleitfähigkeit ( $p = 0,0001$ ) im Vergleich zu  $\text{Na}^+$  signifikant verringert war, ist diese Reduktion nicht allein durch die Verschiebung der Umkehrpotentiale zu negativeren Potentialen und der damit verminderten elektrischen Triebkraft zu erklären. Mögliche Ursachen der kleineren Permeabilität von  $\text{Li}^+$  könnten in einer stärkeren Interaktion von  $\text{Li}^+$  mit der Pore von TRPC5 liegen oder auf eine veränderte Interaktion von  $\text{Li}^+$  mit anderen permeierenden Ionen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend waren die Einzelkanalleitfähigkeiten von TRPC5 in extrazellulären Lösungen mit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  fast identisch, in  $\text{Li}^+$  jedoch drastisch reduziert. Dies deutet darauf hin, dass einerseits die Permeation von  $\text{Li}^+$  intrinsisch oder durch ein weiteres Kation inhibiert wird. Andererseits zeigen diese Daten, dass die Potenzierung der Ganzzellströme von TRPC5 durch Alkalimetall-Ionen (siehe Kap. 3.4.4.1.1) nicht durch einen verstärkten Flux dieser Kationen durch den Kanal hervorgerufen wird, der durch eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeiten zu sehen sein müsste. Im Gegensatz zu den Einzelkanalleitfähigkeiten stieg die

**Tabelle 3.5: Einzelkanalcharakteristika von TRPC5-wt in  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ - und  $\text{Cs}^+$ -basierten, extrazellulären Lösungen.**  $i$ : Einzelkanalamplitude,  $\gamma$ : Einzelkanalleitfähigkeit,  $P_{o,x}/P_{o,Na}$ ,  $f_x/f_{Na}$  und  $t_{o,x}/t_{o,Na}$ : Offenwahrscheinlichkeit, Frequenz und Mittlere Offenzeit relativ zu den Werten in  $\text{Na}^+$ -basierten Lösungen.

$X^+$	$i$ (pA)	$\gamma$ (pS)	$P_{o,x} / P_{o, Na}$	$f_x / f_{Na}$	$t_{o,x} / t_{o,Na}$	$n$
$\text{Li}^+$	$-1,46 \pm 0,02$	$23,4 \pm 0,4$	$5,1 \pm 1,7$	$3,7 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,3$	7
$\text{Na}^+$	$-2,49 \pm 0,08$	$38,9 \pm 1,2$	1	1	1	9
$\text{K}^+$	$-3,05 \pm 0,08$	$42,9 \pm 1,1$	$6,6 \pm 2,2$	$3,1 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,3$	4
$\text{Rb}^+$	$-2,97 \pm 0,14$	$41,9 \pm 2,0$	$11,9 \pm 3,8$	$5,2 \pm 1,1$	$3,1 \pm 0,7$	3
$\text{Cs}^+$	$-3,12 \pm 0,13$	$45,2 \pm 1,9$	$15,7 \pm 6,1$	$8,3 \pm 1,8$	$1,9 \pm 0,5$	5

Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5 drastisch an, wenn  $\text{Na}^+$  gegen ein anderes Alkalimetall-Ion ausgetauscht wurde (Tab. 3.5 und Abb. 3.29C). Dieser Anstieg resultierte dabei zum größten Teil aus einer Erhöhung der Anzahl an Öffnungen pro Sekunde, jedoch war auch eine signifikante, 2-3fache Vergrößerung der mittleren Offenzeiten zu verzeichnen, wenn die Extrazellulärlösung  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  anstatt  $\text{Na}^+$  enthielt (Tab. 3.5 und Abb. 3.29E). Somit ähneln sich die potenzierenden Effekte von Alkalimetall-Ionen und von  $\text{H}^+$ , die ebenfalls aus einer drastischen Erhöhung der mittleren Offenzeiten und der Anzahl an Öffnungen pro Zeitintervall, und damit einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5, resultierten (siehe Kap. 3.3.3).

### 3.4.4.2. Effekte monovalenter Kationen auf Ströme durch TRPC5-Mutanten

#### 3.4.4.2.1. Relative Permeabilitäten der Porenmutanten für Alkalimetall-Ionen

Die Punktmutanten TRPC5-E543Q, -D548N, -E549Q, -E559Q, -E570Q, -N584D, -E595Q, -E598Q und -D633N wurden bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben und auf Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Permeabilität im Vergleich zu TRPC5-wt untersucht. TRPC5-E559Q hatte dabei eine signifikant reduzierte Permeabilität für beide Erdalkalimetall-Ionen gegenüber  $\text{Na}^+$ , und bei TRPC5-N584D sowie TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q war die Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Na}^+$  im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Die Bestimmung der relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen ( $P_X/P_{\text{Na}}$ ) der TRPC5-Mutanten erfolgte wie beim Wildtyp (siehe Kap. 3.4.4.1). Wie in Tabelle 3.6 und Abbildung 3.30 zusammengefasst, waren die  $P_X/P_{\text{Na}}$  aller 9 untersuchten Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert und lagen in der Nähe von 1, was eine schwache Selektivität der Kanäle für Alkalimetall-Ionen aufzeigt. Dies deutet darauf hin, dass durch die Neutralisation negativer Ladungen in der Pore von TRPC5 die Permea-

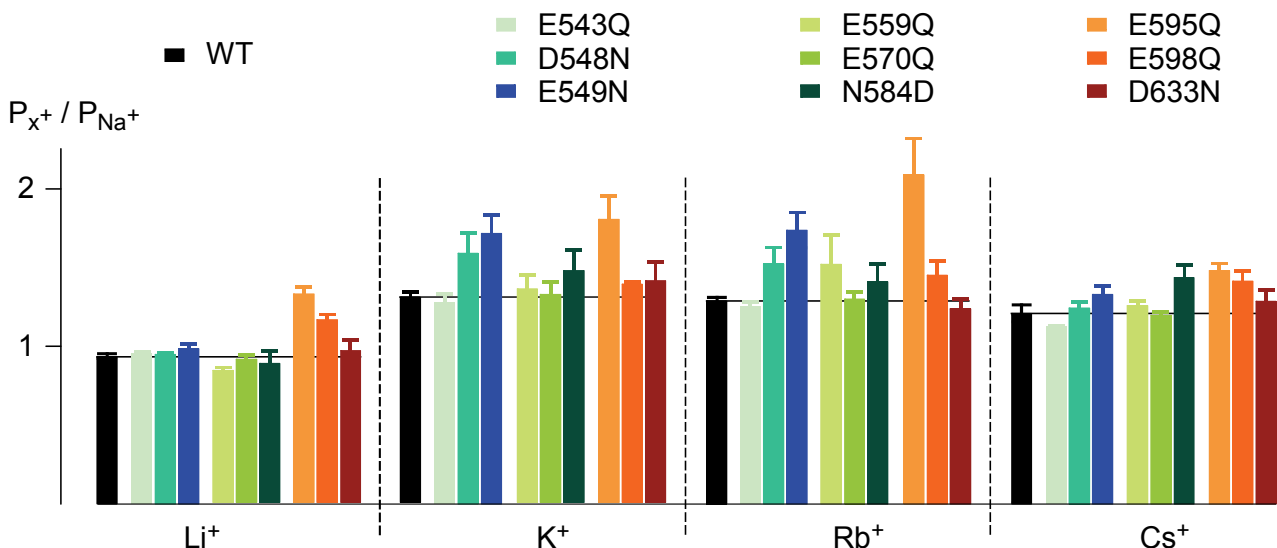


Abbildung 3.30: **Zusammenfassung der relativen Permeabilitäten der Punktmutanten von TRPC5 für  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$ .** Die relativen Permeabilitäten ( $P_X/P_{\text{Na}}$ ) wurden aus den Verschiebungen der Umkehrpotentiale beim Wechsel von  $\text{Na}^+$ - auf  $\text{Li}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Rb}^+$ - oder  $\text{Cs}^+$ -basierte extrazelluläre Lösungen gemäß Gleichung G3.4 ermittelt. Entsprechend der Poreneinteilung aus Abb. 3.23 sind die proximal lokalisierten Punktmutationen (E543Q, D548N, E549Q) in blauen, die zentral lokalisierten (E559Q, E570Q, N584D) in grünen und die distal lokalisierten (E595Q, E598Q, D633N) in roten Farbtönen gehalten.

tion monovalenter Kationen weniger beeinflusst wird als bei divalenten Kationen. Auch die Einführung einer zusätzlichen Ladung in der Nähe des mutmaßlichen Selektivitätsfilters (TRPC5-N584D, siehe Kap. 3.4.2.1) veränderte die  $P_X/P_{\text{Na}}$  im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant. Bis auf zwei Ausnahmen folgten die relativen Permeabilitäten für Alkalimetall-Ionen aller untersuchter Punktmutanten

der Sequenz  $P_{Li} < P_{Na} < P_{Cs} < P_{Rb} < P_K$ , was derselben Eisenman-Reihe (IV) wie bei TRPC5-wt entspricht (Tab. 3.6 und Abb. 3.30). Die beiden Punktmutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q, bei denen jeweils ein Glutamatrest nahe TM6 neutralisiert wurde (siehe Abb. 3.23, Kap. 3.4.2.1) wichen jedoch von dieser Reihe ab und folgten stattdessen mit  $P_{Na} < P_{Li} < P_{Cs} < P_K < P_{Rb}$  einer Sequenz, die keiner der 11 möglichen Permeabilitätssequenzen nach Eisenmann entspricht (Eisenman, 1962, für Reviews siehe Eisenman & Horn, 1983). Eine mögliche Ursache für dieses überraschende Resultat könnten die extrem geringen Einwärtsströme durch TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q in  $Na^+$ -basierten extrazellulären Lösungen sein (Abb. 3.31), die bereits bei der Ermittlung der relativen  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -Permeabilitäten (siehe Kap. 3.4.3) sowie bei der Untersuchung der Potenzierung durch  $H^+$  (siehe Kap. 3.3.4.1) auffielen, und die einen größeren Einfluss von Leckströmen und endogenen Strömen auf die Umkehrpotentiale zur Folge haben könnten. Die Stromdichten in Experimenten mit E595Q ( $-4,1 \pm 0,7$  pA/pF,  $n = 9$ ,  $p = 0,0042$ , Abb. 3.31A und C) und E598Q ( $-3,6 \pm 0,6$  pA/pF,  $n = 10$ ,  $p = 0,0023$ , Abb. 3.31B und D) waren bei  $-60$  mV in  $Na^+$ -basierten extrazellulären Lösungen im Vergleich zum Wildtyp ( $-36,4 \pm 7,0$  pA/pF,  $n = 19$ ) signifikant niedriger, ebenso wie die Umkehrpotentiale der beiden Mutanten in  $Na^+$  (E595Q:  $-5,8 \pm 0,9$  mV,

Tabelle 3.6: **Relative Permeabilitäten von TRPC5 und Mutanten für  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  und  $Cs^+$  gegenüber  $Na^+$ .** n.d. = nicht definiert.

Mutante	$P_{Li} / P_{Na}$	$P_K / P_{Na}$	$P_{Rb} / P_{Na}$	$P_{Cs} / P_{Na}$	Eisenman
WT	$0,93 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,05$	IV
E543Q	$0,95 \pm 0,01$	$1,28 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,01$	IV
D548N	$0,95 \pm 0,01$	$1,59 \pm 0,13$	$1,52 \pm 0,10$	$1,25 \pm 0,04$	IV
E549Q	$0,98 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,11$	$1,74 \pm 0,11$	$1,33 \pm 0,05$	IV
E559Q	$0,84 \pm 0,02$	$1,36 \pm 0,09$	$1,53 \pm 0,18$	$1,27 \pm 0,03$	IV
E570Q	$0,91 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,08$	$1,31 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,02$	IV
N584D	$0,89 \pm 0,08$	$1,48 \pm 0,13$	$1,42 \pm 0,12$	$1,44 \pm 0,08$	IV
E595Q	$1,33 \pm 0,05$	$1,80 \pm 0,15$	$2,09 \pm 0,23$	$1,48 \pm 0,04$	n.d.
E598Q	$1,16 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,09$	$1,41 \pm 0,06$	n.d.
D633N	$0,97 \pm 0,07$	$1,41 \pm 0,11$	$1,24 \pm 0,06$	$1,28 \pm 0,07$	IV

$n = 10$ ,  $p = 0,0001$ , E598Q:  $-5,4 \pm 1,5$  mV,  $n = 9$ ,  $p = 0,0001$ , Abb. 3.31E). In extrazellulären Lösungen mit  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  sowie  $Cs^+$  wurden die Ströme durch TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q jedoch in ähnlichem Maße wie der Wildtyp potenziert, was größere Stromdichten bei negativen Haltepotentialen zur Folge hatte. Die Umkehrpotentiale unterschieden sich in diesen Lösungen dann kaum von denen des Wildtyps, was im Vergleich zu denen in  $Na^+$  mit einem geringeren Fehler erklärt

werden kann. Auf die mit Gleichung G3.4 berechneten Permeabilitäten hatten die selektiv niedrigeren Umkehrpotentiale in  $\text{Na}^+$  im Fall von TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q in jedem Fall zur Folge, dass die  $P_X/P_{\text{Na}}$  dieser Mutanten aufgrund der größeren Verschiebung ( $V_X - V_{\text{Na}}$ ) tendenziell größer waren als beim Wildtyp.

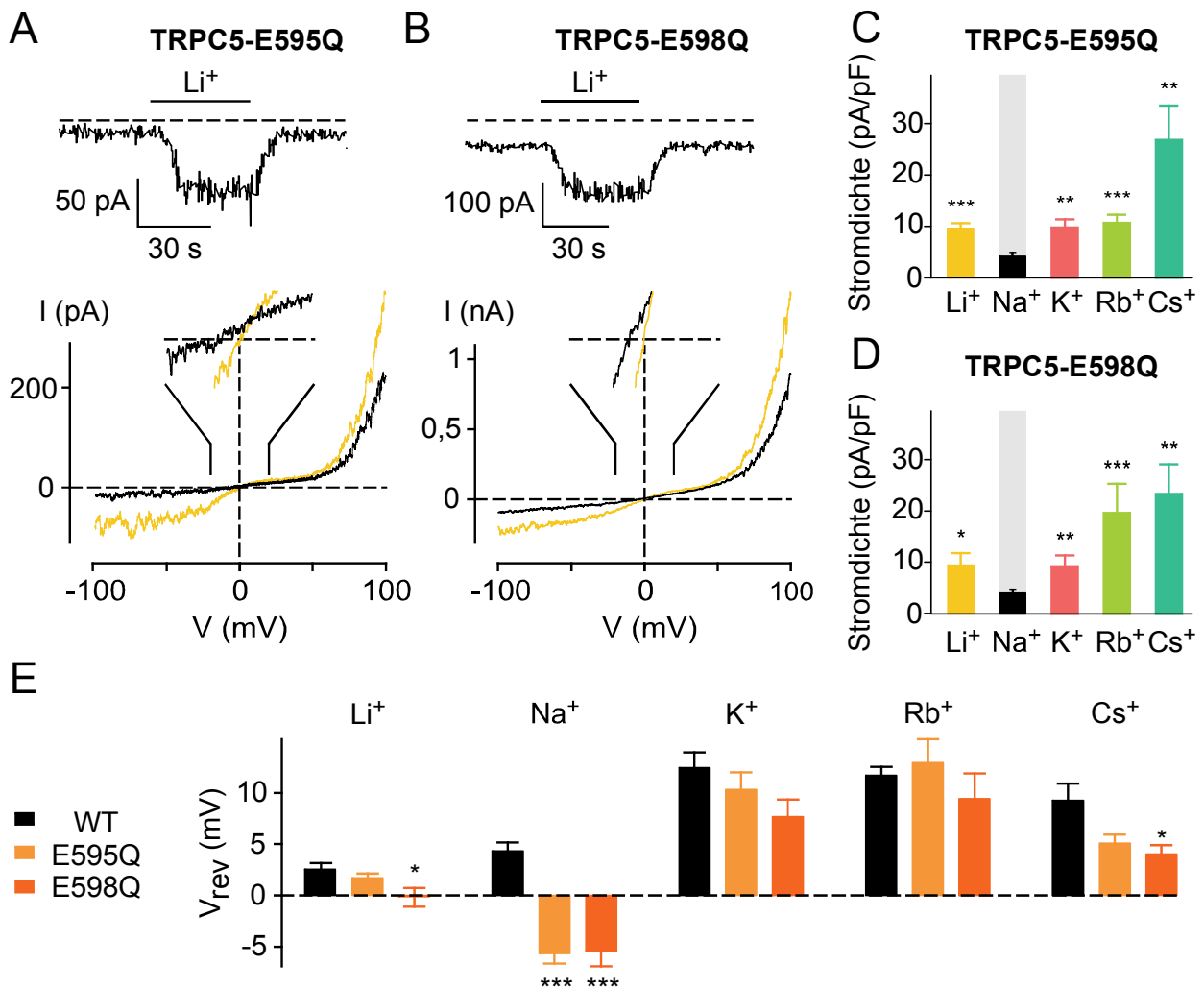


Abbildung 3.31: **Stromdichten und Umkehrpotentiale der TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran.** A und B: Repräsentative Experimente, die die GTP $\gamma$ S-aktivierten Ströme durch TRPC5-E595Q (A) bzw. -E598Q (B) in  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Li}^+$ -basierter Extrazellulärlösung zeigen. *Oben*, Zeitverlauf bei  $-60$  mV. Die schwarzen Balken geben die Dauer der Applikation von  $\text{Li}^+$  an. *Unten*, I-V-Beziehungen der TRPC5-Mutanten in  $\text{Na}^+$  (schwarz) und  $\text{Li}^+$  (gelb). *Inset*, Ausschnitt der Ströme zwischen  $-10$  pA und  $+10$  pA. Die Spannungsachse wurde aus Übersichtsgründen expandiert. C und D: Zusammenfassung der Stromdichten in Experimenten mit TRPC5-E595Q (C) sowie TRPC5-E598Q (D). Man beachte die extrem geringen Stromdichten der Mutanten in  $\text{Na}^+$ -basierter extrazellulärer Lösung. Der graue Balken zeigt die mittlere Stromdichte von TRPC5-wt mit  $\text{Na}^+$  auf der extrazellulären Membran. Die Sternchen symbolisieren jeweils die Signifikanz zwischen den Stromdichten in  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  im Vergleich zu  $\text{Na}^+$ . E: Umkehrpotentiale von TRPC5-wt (schwarz), TRPC5-E595Q (hellorange) und TRPC5-E598Q (orange) in extrazellulären Lösungen mit den verschiedenen Alkalimetall-Ionen. Auffallend ist, dass nur in  $\text{Na}^+$ -basierter Lösung dramatische Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten E595Q und E598Q bestanden.

Somit begründen sich auch die atypischen Selektivitätsreihen für Alkalimetall-Ionen bei diesen Mutanten zum großen Teil auf die kleineren Umkehrpotentiale in  $\text{Na}^+$ , die höchstwahrscheinlich nicht auf eine niedrigere Permeabilität von E595Q und E598Q für  $\text{Na}^+$ , sondern eher auf Fehler durch Leck- oder endogene Ströme zurückzuführen sind.

Zusammenfassend verhielten sich die relativen Permeabilitäten für Alkalimetall-Ionen aller untersuchten Punktmutanten von TRPC5 ähnlich der des Wildtyps. Die Permeation monovalenter Kationen durch TRPC5 scheint somit unabhängig von den Ladungen, welche durch die eingeführten Mutationen neutralisiert wurden, zu funktionieren und wurde auch durch die Einführung einer Ladung am Asparaginrest 584 (N584D) nicht signifikant beeinflusst.

#### 3.4.4.2.2. Potenzierung der Ströme durch TRPC5-Punktmutanten durch Alkalimetall-Ionen

Wie TRPC5-wt wurden auch die oben genannten Punktmutanten beim Austausch von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  durch andere Alkalimetall-Ionen stark potenziert. Die einzige Ausnahme bildete die Mutante TRPC5-E543Q, die mit 140 mM  $\text{Li}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran in einigen Experimenten nur schwach potenziert

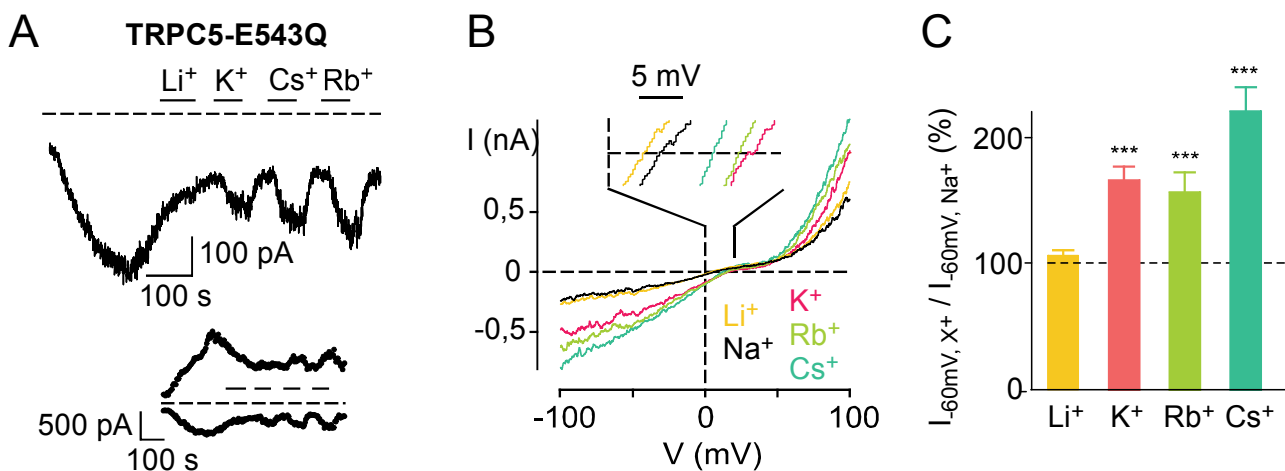


Abbildung 3.32: **Effekte von Alkalimetall-Ionen auf Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q.** A: Zeitverlauf von TRPC5-E543Q, aktiviert durch  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Infusion ins Cytosol über die Patch-Pipette, bei -60 mV mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  oder  $\text{Rb}^+$  (schwarze Balken) bzw.  $\text{Na}^+$  (jeweils 140 mM) auf der extrazellulären Seite der Membran. *Inset*, Zeitverlauf des gleichen Experiments bei  $\pm 100$  mV. Die Einwärts- und Auswärtsströme durch TRPC5-E543Q werden durch  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  und  $\text{Rb}^+$  deutlich geringer potenziert als die des Wildtyps. B: I-V-Beziehungen von TRPC5-E543Q bei in 140 mM extrazellulärem  $\text{Na}^+$  (schwarz),  $\text{Li}^+$  (gelb),  $\text{K}^+$  (rot),  $\text{Rb}^+$  (grün) oder  $\text{Cs}^+$  (blau) aus dem in A gezeigten Experiment. *Inset*, Der Ausschnitt der Ströme zwischen -10 pA und +10 pA verdeutlicht die Lage der Umkehrpotentiale in den verschiedenen extrazellulären Lösungen. Die Spannungsachse wurde aus Gründen der besseren Übersicht expandiert. C: Zusammenfassung der Potenzierung von TRPC5-E543Q bei -60 mV durch Alkalimetall-Ionen (n = 8-14). Die Sternchen symbolisieren die Signifikanz gegenüber den Amplituden in  $\text{Na}^+$  (100%).

( $n = 7/14$ ) und in einigen sogar inhibiert wurde ( $n = 5/14$ , Abb. 3.32). Im Mittel betrug die Amplitude von TRPC5-E543Q in  $\text{Li}^+$  relativ zu  $\text{Na}^+$   $105 \pm 14\%$  ( $n = 14$ ,  $p = 0,0001$  vgl. TRPC5-wt). In extrazellulären Lösungen mit  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  wurden die Ströme durch diese Mutante zwar stets potenziert, jedoch in viel geringerem Maße als TRPC5-wt (Abb. 3.32C). Die Ursachen dieser reduzierten Potenzierung wurden im *Outside-Out*-Modus auf Einzelkanalebene näher untersucht (Abb. 3.33). Wie bereits in Kapitel 3.3.4.2 gezeigt, war TRPC5-E543Q in extrazellulären Lösungen, die 140 mM  $\text{Na}^+$  enthielten, deutlich aktiver als der Wildtyp. Daher wurden die Experimente an HEK-Zellen mit dieser Mutante bereits 24 h nach Transfektion durchgeführt. Die durchschnittliche Offenwahrscheinlichkeit ( $nP_o$ ) lag mit  $0,18 \pm 0,06$  ( $n = 4$ ,  $p = 0,0084$  vgl. TRPC5-wt) trotzdem deutlich über der von TRPC5-wt (48 h nach Transfektion). Die Einzelkanalamplitude von E543Q war hingegen mit  $-2,32 \pm 0,08$  pA ( $n = 5$ ,  $p = 0,1729$  vgl. TRPC5-wt) ähnlich groß wie die des Wildtyps ( $-2,49 \pm 0,08$  pA,  $n = 8$ ) und verkleinerte sich beim Wechsel auf  $\text{Li}^+$ -basierte Lösungen sogar noch etwas stärker als TRPC5-wt auf  $-1,24 \pm 0,07$  pA ( $n = 5$ ,  $p = 0,0063$  vgl. TRPC5-wt, Abb. 3.33A und B). Die Reduktion der Einzelkanalamplitude wurde von einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit um durchschnittlich  $132 \pm 35\%$  ( $n = 4$ ) begleitet, was weniger als der Hälfte der Effekte beim Wildtyp entsprach ( $406 \pm 166\%$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0,2263$ ), aufgrund der hohen Streuung in den verschiedenen Zellen jedoch nicht signifikant war. In extra-

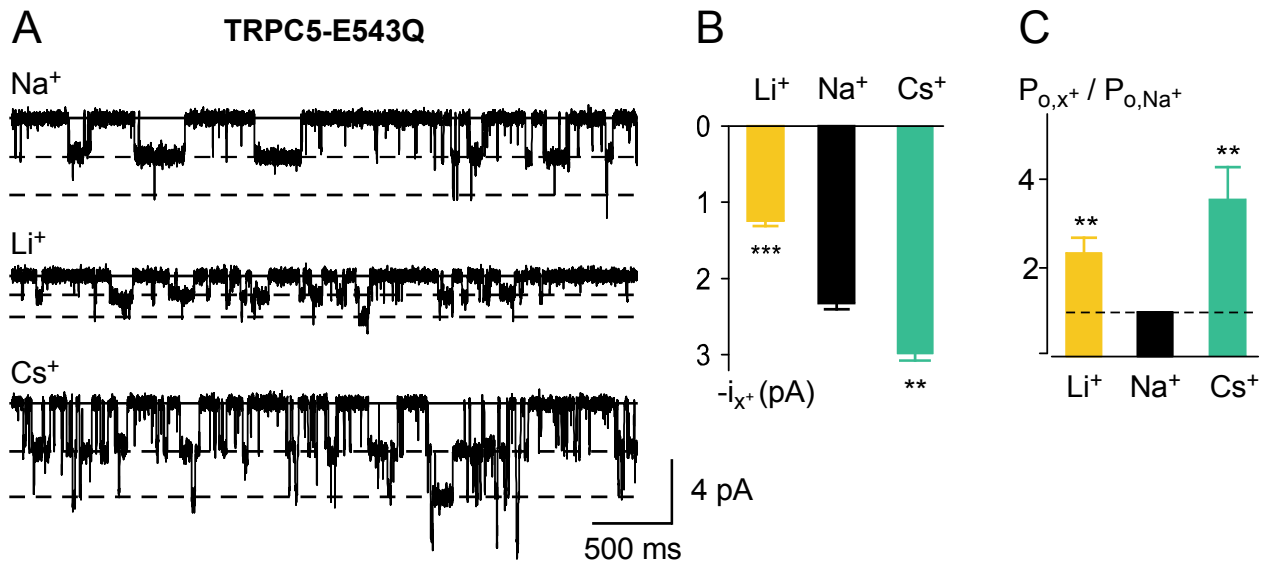


Abbildung 3.33: **Effekte von  $\text{Li}^+$  und  $\text{Cs}^+$  auf Einzelkanalströme durch TRPC5-E543Q.** A: Einzelkanalspuren (*Outside-Out*) von TRPC5-E543Q bei -60 mV mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  (jeweils 140 mM) auf der extrazellulären Seite der Membran. Die durchgezogenen Linien markieren jeweils den geschlossenen Zustand von TRPC5-E543Q, die gestrichelten Linien den/die offenen Zustände. B: Zusammenfassung der Einzelkanalamplituden ( $i$ ) von TRPC5-E543Q in extrazellulären Lösungen mit den verschiedenen Alkalimetall-Ionen. C: Zusammenfassung der Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5-E543Q in  $\text{Li}^+$ - und  $\text{Cs}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen relativ zu den Werten in  $\text{Na}^+$ . Die Daten in B und C beinhalten Daten aus 4 bzw. 5 unabhängigen Experimenten.



zellulären Lösungen, die 140 mM Cs<sup>+</sup> enthielten, betrug die Einzelkanalamplitude von TRPC5-E543Q  $-2,97 \pm 0,10$  pA ( $n = 4$ ,  $p = 0,4246$  vgl. TRPC5-wt). Auch unter diesen Bedingungen erhöhte sich die mittlere Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle ( $742 \pm 354\%$ ,  $n = 4$ ) nur etwa halb so stark wie beim Wildtyp ( $1570 \pm 605\%$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0,3665$ ). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Potenzierung der Mutante TRPC5-E543Q beim Austausch des extrazellulären Na<sup>+</sup> gegen ein anderes Alkali-metall-Ion im *Whole-Cell*-Modus geringer als beim Wildtyp ist, weil die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit, die mit diesem Lösungswechsel einhergeht, geringer ausfällt. Die Reduktion der Ganzzellströme durch TRPC5-E543Q in extrazellulärem Li<sup>+</sup> ist auf die Reduktion der Einzelkanalamplituden unter diesen Bedingungen zurückzuführen.

#### 3.4.4.2.3. Einzelkanaluntersuchung der TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q

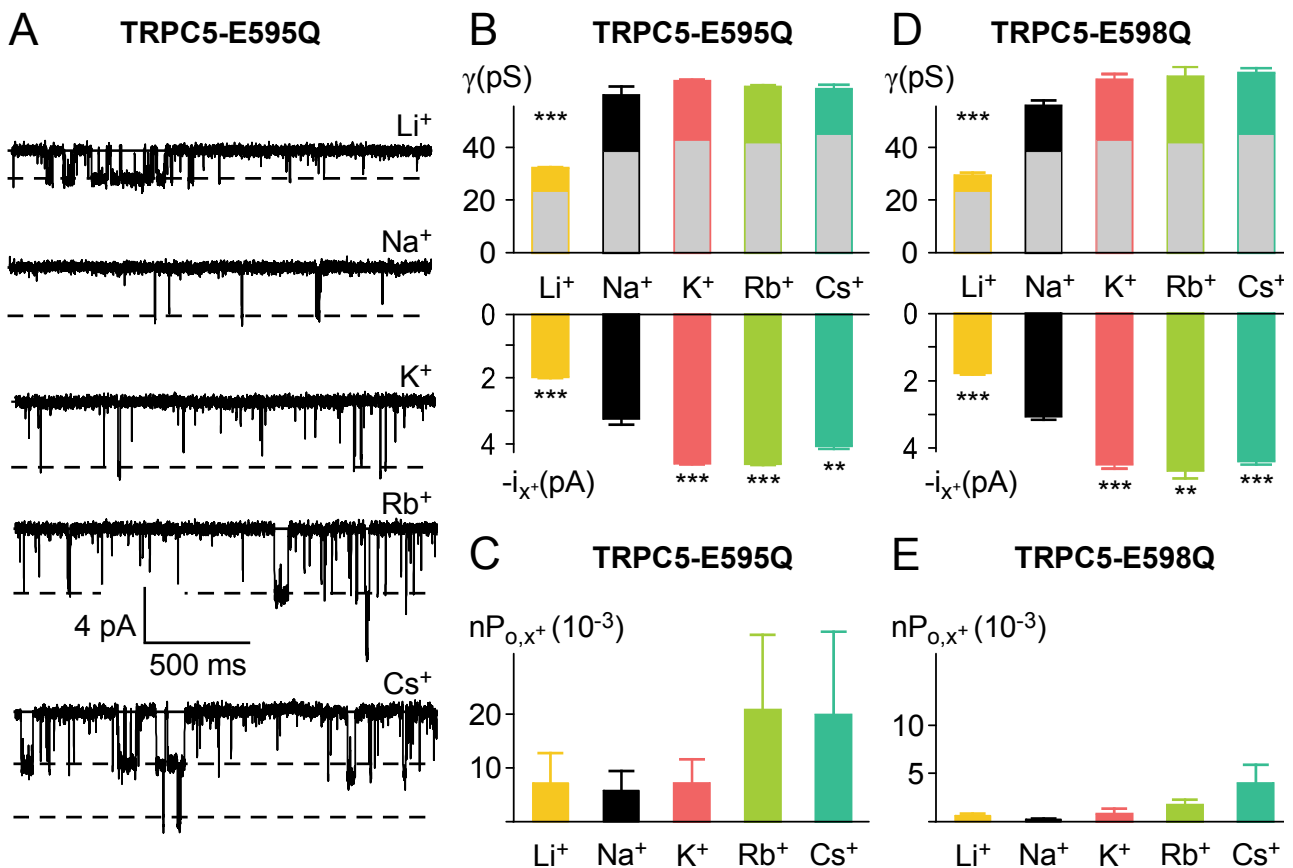
Die TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q zeichneten sich bei der Bestimmung der relativen Permeabilitäten für Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup> (siehe Kap. 3.4.3.1) und für Alkali-metall-Ionen (siehe Kap. 3.4.4.2.1) gegenüber Na<sup>+</sup> durch signifikant reduzierte Umkehrpotentiale in Na<sup>+</sup>-basierten extrazellulären Lösungen aus. Aufgrund der extrem niedrigen Einwärtsströme durch diese Mutanten wurde eine hohe Fehler-behaftung der Umkehrpotentiale jeweils als wahrscheinlicher angesehen als eine niedrigere Permeabilität für Na<sup>+</sup>. Um genaueren Einblick in die Eigenschaften von TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q zu erhalten, wurden auch diese Mutanten im *Outside-Out*-Modus auf Einzelkanalebene untersucht.

Tabelle 3.7: **Einzelkanalamplitude (i) und Einzelkanalleitfähigkeit (γ) von TRPC5-E595Q und E598Q in extrazellulären Lösungen mit verschiedenen Alkalimetallionen.**

X <sup>+</sup>	TRPC5-E595Q		TRPC5-E598Q	
	i (pA)	γ (pS)	i (pA)	γ (pS)
Li <sup>+</sup>	$-1,97 \pm 0,04$	$31,8 \pm 0,6$	$-1,77 \pm 0,06$	$29,5 \pm 1,0$
Na <sup>+</sup>	$-3,25 \pm 0,18$	$59,9 \pm 3,2$	$-3,06 \pm 0,10$	$56,0 \pm 1,7$
K <sup>+</sup>	$-4,60 \pm 0,05$	$65,1 \pm 0,4$	$-4,47 \pm 0,13$	$65,9 \pm 2,0$
Rb <sup>+</sup>	$-4,58 \pm 0,03$	$63,0 \pm 0,6$	$-4,66 \pm 0,23$	$67,2 \pm 3,4$
Cs <sup>+</sup>	$-4,06 \pm 0,10$	$62,3 \pm 1,5$	$-4,37 \pm 0,12$	$68,3 \pm 1,8$

Ein interessantes Ergebnis der Einzelkanalstudie in Kapitel 3.3.4.2 war die erhöhte Einzelkanalamplitude bei -60 mV in allen TRPC5-Mutanten, in denen der Glutamat-rest E595 neutralisiert wurde. Dies warf hier zunächst die Frage auf, wie sich die Amplituden der Einzelkanäle von TRPC5-E595Q verhalten, wenn statt hauptsächlich Na<sup>+</sup> andere Alkalimetall-Ionen permeieren. Abbildung 3.34A zeigt Ausschnitte aus einem solchen Experiment, in dem dieselben extrazellulären

Lösungen wie im *Whole-Cell-Modus* (siehe Kap. 3.4.4.2.1), basierend auf entweder  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$ , von der extrazellulären Seite der Membran appliziert wurden. In  $\text{Na}^+$ -basierten Lösungen war die Einzelkanalamplitude von TRPC5-E595Q in Übereinstimmung mit den Daten aus Kapitel 3.3.4.2 mit  $-3,25 \pm 0,18$  pA ( $n = 3$ ) signifikant größer als die von TRPC5-wt ( $p = 0,0014$ ). In Lösungen mit 140 mM  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  nahmen diese nochmals zu, während es in  $\text{Li}^+$ -basierten Lösungen zu einer Abnahme kam (Abb. 3.34B). Die Einzelkanalamplitude von TRPC5-E595Q war jedoch mit allen verwendeten extrazellulären Lösungen größer als die des Wildtyps unter denselben Bedingungen (Tab. 3.7). Dies traf auch auf die Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5-E595Q zu, welche aus der Einzelkanalamp-



**Abbildung 3.34: Effekte von Alkalimetall-Ionen auf die Einzelkanalströme durch die TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q.** A: Einzelkanalspuren (*Outside-Out*) von TRPC5-E595Q bei  $-60$  mV mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran (jeweils 140 mM). Die durchgezogenen Linien markieren jeweils den geschlossenen Zustand des Kanals, die gestrichelten Linien die offenen Zustände. B und D: Zusammenfassung der Einzelkanalamplitude ( $i$ ) und Einzelkanalleitfähigkeit ( $\gamma$ ) von TRPC5-E595Q (B) und TRPC5-E598Q (D) in extrazellulären Lösungen mit den verschiedenen Alkalimetall-Ionen aus  $n = 3-5$  Experimenten. Während die Amplituden entweder signifikant größer ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) bzw. kleiner ( $\text{Li}^+$ ) als in  $\text{Na}^+$  waren (siehe A), unterschieden sich die Leitfähigkeiten von TRPC5 nur in  $\text{Li}^+$  signifikant von denen in  $\text{Na}^+$ . Die grauen Balken zeigen jeweils die mittlere Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5-wt zum Vergleich. C und E: Zusammenfassung der Offenwahrscheinlichkeiten ( $nP_o$ ) von TRPC5-E595Q (C) und TRPC5-E598Q (E) in  $\text{Li}^+$ -,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Rb}^+$ - und  $\text{Cs}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen. Man beachte die 1000-fache Skalierung der  $nP_o$ -Achse.

litude und dem Umkehrpotential aus dem *Whole-Cell*-Modus (siehe Kap. 3.4.4.2.1) berechnet wurde (Tab. 3.7 und Abb. 3.34B). Interessanterweise war das Verhältnis der Einzelkanalleitfähigkeiten von TRPC5-E559Q und TRPC5-wt in den verschiedenen Lösungen jeweils konstant, und lag bei  $1,46 \pm 0,04$ . Dies deutet darauf hin, dass die Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5-wt über die negative Seitenkette des Glutamatrests E595 und unabhängig von Alkalimetall-Ionen reduziert wird. Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte eine Interaktion des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) oder  $\text{Mg}^{2+}$  (1 mM) mit E595 sein. Die Neutralisation des zweiten Glutamatrests im nahe TM6 gelegenen EFTE-Motiv durch Punktmutation, E598Q, bewirkte ähnliche Effekte wie die Neutralisation von E595. Auch TRPC5-E598Q hatte eine signifikant größere Einzelkanalamplitude als TRPC5-wt (Abb. 3.34 D und E). Die Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5-E598Q in extrazellulären Lösungen mit den verschiedenen Alkalimetall-Ionen korrelierte mit der von TRPC5-E595Q (TRPC5-wt) und war in den verschiedenen Lösungen jeweils  $1,47 \pm 0,07$ -mal größer als beim Wildtyp (Tab. 3.7). Daher scheint der Glutamatrest E598 einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf den Ionenflux monovalenter Kationen durch TRPC5 zu haben wie E595. Wie die geringen Ganzzellströme vermuten ließen (siehe Kap. 3.4.4.2.1), fielen die Einzelkanalströme (-60 mV) der TRPC5-Mutanten E595Q und E598Q durch eine extrem kleine Spontanaktivität auf (Abb. 3.34C und E). Im Mittel waren die Offenwahrscheinlichkeiten ( $nP_o$ ) von TRPC5-E595Q (z.B. in  $\text{Na}^+$ :  $0,0057 \pm 0,0036$ ,  $n = 3$ ) und TRPC5-E598Q ( $\text{Na}^+$ :  $0,0003 \pm 0,0001$ ,  $n = 3$ ) bei -60 mV so gering, dass eine quantitative Analyse von  $nP_o$  nicht möglich war. Qualitativ war jedoch festzustellen, dass, wie beim Wildtyp, die  $nP_o$  beider Mutanten größer wurde, wenn statt  $\text{Na}^+$  ein anderes Alkalimetall-Ion in der extrazellulären Lösung zugegen war. Dies deutet darauf hin, dass die Potenzierung der Ströme durch TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q, die im *Whole-Cell*-Modus beobachtet wurde (siehe Abb. 3.31C und D, Kap. 3.4.4.2.1), ähnlich wie beim Wildtyp auch auf einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit basiert.

Diese Daten zeigen, dass die beiden Glutamatreste E595 und E598 gleichsam eine Rolle bei der Regulation des Fluxes monovalenter Kationen durch TRPC5 spielen. Die Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5 vergrößerte sich jeweils um etwa 50%, wenn eine der beiden Glutamatreste durch Punktmutation neutralisiert wurde. Der inhibitorische Effekt der negativen Seitenketten von E595 und E598 auf den TRPC5-Einzelkanalstrom ist möglicherweise auf eine Interaktion mit divalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) zurückzuführen.

### 3.4.2. Ionenpermeation durch TRPC3 und TRPC6

In vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit wurden bereits einige Unterschiede in der Regulation zwischen TRPC5 und den Gruppe-3-TRPC-Kanälen TRPC3 und

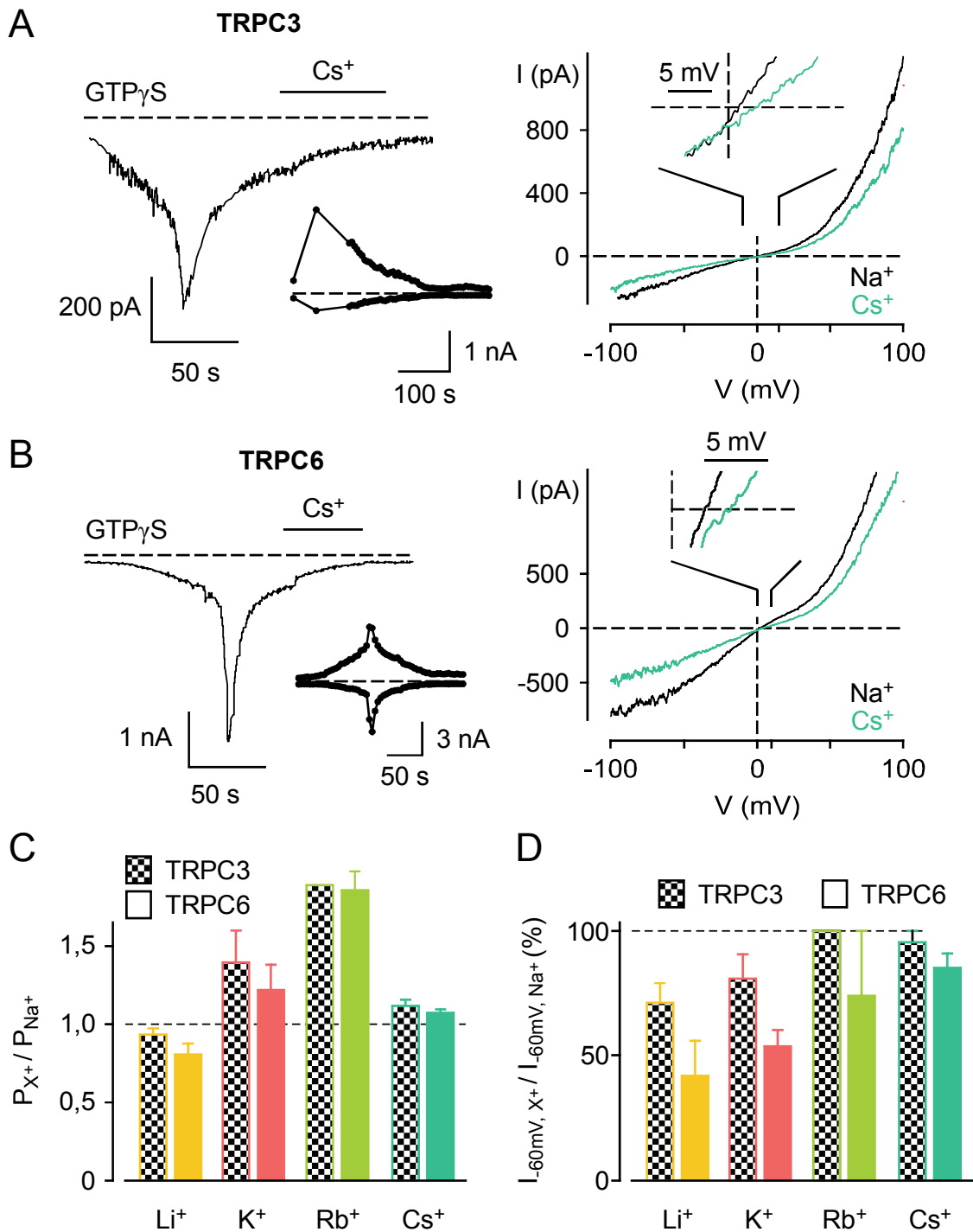


Abbildung 3.35: **Permeation von Alkalimetall-Ionen durch TRPC3 und TRPC6.** A und B: Repräsentative Experimente zur Ionenpermeation mit TRPC3 (A) oder TRPC6 (B). *Oben*, Zeitverlauf der GTP $\gamma$ S-aktivierten Ströme durch TRPC3 bzw. TRPC6 (-60 mV) in 140 mM Cs<sup>+</sup> (schwarze Balken) bzw. Na<sup>+</sup> auf der extrazellulären Seite der Membran. *Inset*, Zeitverlauf des jeweils gleichen Experiments bei  $\pm 100$  mV. Die Einwärts- und Auswärtsströme durch TRPC3 bzw. TRPC6 wurden durch Cs<sup>+</sup> eher inhibiert statt potenziert. C: Relative Permeabilitäten der Alkalimetall-Ionen gegenüber Na<sup>+</sup> aus jeweils 3-6 Experimenten mit TRPC3 (karierte Balken) oder TRPC6 (glatte Balken). Die relativen Permeabilitäten beider Gruppe-3-TRPC-Kanäle folgten der Eisenmann-Reihe III. D: Effekte von Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> und Cs<sup>+</sup> auf die Amplituden der Ganzzellströme (-60 mV) durch TRPC3 (kariert) oder TRPC6 (glatt) im Vergleich zu Na<sup>+</sup> (n = 3-6). Die Effekte von Rb<sup>+</sup> auf TRPC3 wurden lediglich in einem Experiment untersucht.

TRPC6 heraus- gestellt (siehe Kap. 3.2.3.2 und Kap. 3.3.5). Auch das Verhalten der GTP $\gamma$ S-aktivierten Ströme durch diese beiden Kanäle in Anwesenheit von extrazellulären Lösungen, die statt hauptsächlich Na<sup>+</sup> andere Alkalimetall-Ionen enthielten, unterschied sich von den Strömen durch TRPC5 (Abb. 3.35). Die relativen Permeabilitäten der Alkalimetall-Ionen folgten sowohl im Falle von TRPC3 als auch von TRPC6 der Sequenz Li<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><Cs<sup>+</sup><K<sup>+</sup><Rb<sup>+</sup>, was der Eisenman-Reihe III und damit einem Selektivitätsfilter mit ähnlicher Feldstärke wie bei TRPC5 entspricht. Jedoch kam es, wie in Abbildung 3.35A und B für Cs<sup>+</sup> gezeigt, nicht zu einer Potenzierung, sondern eher zu einer sehr schwachen, reversiblen Inhibition der Ströme infolge des Wechsels zu extrazellulären Lösungen mit Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> oder Cs<sup>+</sup> (Abb. 3.35D). Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, dass die Ionenpermeation durch TRPC3 bzw. TRPC6 und durch TRPC5 sehr ähnlich ist. Die Potenzierung der Ströme durch extrazellulär applizierte Alkalimetall-Ionen (Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> und Cs<sup>+</sup>) ist wie die Potenzierung durch extrazelluläre H<sup>+</sup> jedoch nur für TRPC5, nicht jedoch für TRPC3 bzw. TRPC6 gegeben. Demzufolge findet bei letzteren Kanälen keine Regulation der Aktivität durch extrazelluläre Ladungsträger statt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Spannungsabhängigkeit der klassischen TRP-Kanäle

TRPC5 ist ein unselektiver Kationenkanal, der durch PLC-abhängige, intrazelluläre Signalwege aktiviert wird. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivität von TRPC5 auch durch das Membranpotential beeinflusst wird. TRPC5 weist die typischen Charakteristika eines spannungsabhängigen Kanals auf, mit einer zeitabhängigen Zunahme der Ströme am Anfang, und Tailströmen am Ende von depolarisierenden Spannungspulsen. Diese aktivierenden und deaktivierenden Kinetiken sind weniger auf einen kationischen Block der Pore als vielmehr auf spannungsabhängige Öffnungen und Schließungen der Kanäle zurückzuführen (siehe Kap. 3.2.1). Somit zeigt sich, dass neben Mitgliedern aus anderen TRP-Subfamilien (z.B. TRPV1, TRPM8) auch klassische TRP-Kanäle (TRPC) spannungsabhängig reguliert werden.

Um die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 mit denen anderer Kanäle vergleichen zu können, wurde seine Leitfähigkeit ( $g$ , *slope conductance*) bei unterschiedlich starker PLC-abhängiger Aktivierung im Bereich zwischen -120 mV und +200 mV ermittelt (siehe Kap. 3.2.2.). Die  $g$ -V-Beziehungen verliefen im untersuchten Spannungsbereich langsam ansteigend. Eine sigmoidale Form, wie sie bei anderen spannungsabhängigen Kanälen beobachtet wurde (z.B. Aggarwal & MacKinnon, 1996, Nilius *et al.*, 2005), war bei TRPC5 jedoch nur andeutungsweise erkennbar: Einerseits wurde bei sehr negativen Potentialen (-120 mV) selten ein unteres Plateau erreicht ( $g_{\min}$ ), und andererseits sättigten die  $g$ -V-Beziehungen bei sehr positiven Potentialen (+200 mV) noch nicht. Der langsame Anstieg der  $g$ -V-Beziehungen drückt aus, dass die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 nur sehr schwach ausgeprägt ist. Die Ursache hierfür liegt höchstwahrscheinlich im Spannungssensor, welcher Änderungen des Membranpotentials mit der Öffnung und Schließung des Kanals koppelt. Im Falle von TRPC5 liegt dieser offensichtlich zu weit abseits des elektrischen Feldes der Zellmembran oder besitzt nur sehr wenige Ladungen (*gating charges*). Tatsächlich ergab eine Abschätzung der *gating charge*  $z$  von TRPC5 mithilfe eines *Two State Models* einen Wert von maximal 0,3 Valenzen. Im Vergleich zu anderen spannungsabhängigen Kanälen ist dies sehr gering. Klassische spannungsabhängige Kanäle wie z.B. der *Shaker*  $K^+$ -Kanal ( $z = 13,6$ , Aggarwal & MacKinnon, 1996) besitzen eine um 1 - 2 Größenordnungen höhere *gating charge*. Andere spannungsabhängige TRP-Kanäle (TRPV1, TRPM4 und TRPM8) haben zwar im Vergleich dazu auch relativ kleine *gating charges*. Jedoch liegen bei ihnen die Werte zwischen 0,7 und 0,9 (Nilius *et al.*, 2005, Voets *et al.*, 2007), und damit deutlich über TRPC5.

Die molekulare Identität von *gating charges* liegt prinzipiell in geladenen Seitenketten der Kanalproteine. Bei spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen befinden

sich die entsprechenden, basischen Aminosäuren im Bereich der 4. Transmembrandomäne (Aggarwal & MacKinnon, 1996). Auch bei TRPM8 wurden mehrere positiv geladene Aminosäuren in TM4 und zwischen TM4 und TM5 identifiziert, welche zur *gating charge* des Kanals beisteuern (Voets *et al.*, 2007). Im Bereich zwischen TM4 und TM5 besitzt TRPC5 hingegen nur sehr wenige geladene Aminosäuren (Abb. 4.1), was seine kleine *gating charge* und seine daraus resultierende schwache Spannungsabhängigkeit begründen könnte. Während der



Abbildung 4.1: **Sequenzvergleich von TRPC5 und TRPM8 im Bereich um TM4 und TM5.** Basische Aminosäuren sind durch Pfeile markiert. Bei TRPM8 ändert sich die *gating charge*, wenn eine der markierten Aminosäuren neutralisiert wird (Voets *et al.*, 2007).

PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC5 änderten sich seine g-V-Beziehungen in einer Weise, die eine Verschiebung entlang der Spannungsachse nahelegten. Anders herum könnte man formulieren, dass die Aktivierung von TRPC5 durch PLC-Stimulation nichts anderes ist, als eine Modifizierung seiner Spannungsabhängigkeit. Folglich würde TRPC5 primär durch Membrandepolarisation aktiviert werden, jedoch mit g-V-Beziehungen, die im Ruhezustand eine sehr positive halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_{1/2}$  ca. 380 mV, siehe Kap. 3.2.2) aufweisen. Infolge der Aktivierung von  $G_q$ -koppelnden Signalwegen werden dann die g-V-Beziehungen zu weniger depolarisierenden Potentialen ( $V_{1/2}$  ca. 0 mV, siehe Kap. 3.2.2) verschoben. Dies führt letztendlich zur erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle bei physiologischen Membranspannungen. Für liganden- oder temperaturabhängige TRP-Kanäle gilt ein solcher Mechanismus bereits als ein fundamentales Prinzip der Aktivierung (Voets *et al.*, 2004, Nilius *et al.*, 2005, Talavera *et al.*, 2005). Grundlage ist ein einfaches *Two-State-Model*, welches nur zwei Zustände eines Kanals berücksichtigt (siehe Kap. 2.4.2.3 und Kap. 3.2.2). Über die Einfachheit eines Modells mit nur zwei Zuständen räumen Nilius *et al.* (2005) selbst ein, dass es „möglicherweise eine Übersimplifizierung aller Feinheiten des Gatings“ von TRP-Kanälen ist. Für TRPV1 und TRPM8 sind daher auch allosterische Modelle zur Erklärung der biophysikalischen Eigenschaften der Ströme verwendet worden (Brauchi *et al.*, 2004, Matta & Ahern, 2007, Voets *et al.*, 2007). Diese betrachten, anders als beim *Two-State-Model*, die Spannung nicht als primären Aktivationsstimulus, der durch Temperatur oder Liganden lediglich modifiziert wird. Vielmehr ist das Membranpotential bezogen auf Temperatur und Liganden ein gleichwertiger Aktivator, wobei sich die verschiedenen Stimuli gegenseitig (allosterisch) beein-

flussen (Abb. 4.2A). Daher müssen statt zwei Offenzuständen eines Kanals acht Zustände angenommen werden. Die Anwendbarkeit dieses allosterischen Modells auf die Spannungsabhängigkeit von TRP-Kanälen ist jedoch zurzeit noch umstritten. Am Beispiel von TRPM8 wurde gezeigt, dass sich dieses Modell durch Vereinfachungen in ein Zwei-Zustands-Modell zurückverwandelt (Voets *et al.*, 2007). Die Berechnungen von Voets *et al.* (2007) beruhen auf dem experimentellen Befund, dass  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  während der Aktivierung von TRPM8 unverändert bleiben. Aus der gleichen Arbeitsgruppe wurde dies auch für TRPV1, TRPM4 und TRPM5 gezeigt (Nilius *et al.*, 2003, Voets *et al.*, 2004, Nilius *et al.*, 2005, Talavera *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wurde in zwei unabhängigen Studien gefunden, dass sich sowohl bei TRPV1 (Matta & Ahern, 2007) als auch bei TRPM8 (Brauchi *et al.*, 2004) jeweils sowohl die minimale als auch die maximale Leitfähigkeit während der liganden- und temperaturabhängigen Aktivierung verändern. Aufgrund dessen kommt für die Verfasser dieser Arbeiten nur ein allosterisches Modell als Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von TRPV1 und TRPM8 in Frage.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Spannungsabhängigkeit von TRPC5 ist eine Veränderung von  $g_{\min}$  und/oder  $g_{\max}$  während der PLC-abhängigen Aktivierung des Kanals ebenfalls möglich. Aufgrund der unvollständigen Leitfähigkeitskurven konnte dies jedoch nicht hinreichend überprüft werden (siehe Kap. 3.2.2). Es gibt aber Gründe, die bei TRPC5 eher für ein allosterisches Modell mit veränderlicher  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  sprechen. Erstens würde, gemäß dem einfacheren *Two-State-Model*, eine alleinige Verschiebung der  $g$ - $V$ -Beziehungen entlang der Spannungsachse bedeuten, dass sich  $V_{1/2}$  während der Aktivierung um ca. 400 mV oder sogar mehr verringern müsste (siehe Kap. 3.2.2.). Im Vergleich zu anderen TRP-Kanälen, bei denen ein *Two-State-Model* angewendet wurde, ist dies eine außerordentlich große Veränderung von  $V_{1/2}$ . Für TRPV1 wurde etwa gezeigt, dass bei maximaler Hitzestimulation (42°C) eine Linksverschiebung der  $g$ - $V$ -Beziehungen um etwa 200 mV stattfindet (Nilius *et al.*, 2005). Ein zweites Argument gegen ein Modell mit nur zwei Zuständen ergab sich aus den Tailströmen von TRPC5 am Ende von depolarisierenden Spannungspulsen (siehe Kap. 3.2.2). Diese ließen sich weitaus adäquater mit einer doppel-exponentiellen Funktion fitten als mit einer mono-exponentiellen. Beim *Two-State-Model* sollten die Tailströme jedoch nur eine zeitabhängige Komponente besitzen. Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 wahrscheinlich komplizierter ist, als durch ein simples Modell mit zwei Zuständen beschrieben werden könnte. Die Verwendung von Modellen mit mehr als zwei Zuständen ist jedoch praktisch nicht möglich. Einerseits dehnen sich die  $g$ - $V$ -Beziehungen aufgrund der kleinen *gating charge* von TRPC5 über einen experimentell nicht erfassbaren Spannungsraum aus. Dies verhindert die Ermittlung der Offenwahrscheinlichkeit. Andererseits muss für die Anwendung von allosterischen Modellen die Offenwahrscheinlichkeit



des Kanals in Abhängigkeit eines direkten Liganden bzw. Stimulus bei konstanten Membranpotentialen getestet werden. Ein solcher direkter, intrazellulärer Aktivator ist für TRPC5 bis heute noch unbekannt.

In einer kürzlich erschienenen Studie wurden Ergebnisse über die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 vorgestellt, die denen aus der vorliegenden Arbeit sehr ähneln (Obukhov & Nowycky, 2008). Die Autoren sehen jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen der spannungsabhängigen Aktivierung von TRPC5 und seiner PLC-vermittelten Aktivierung. Vielmehr wird postuliert, dass TRPC5 während der PLC-abhängigen Aktivierung vier individuelle Phasen durchläuft, die durch unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften des Kanals voneinander unterscheidbar sind. Zu diesen Eigenschaften zählen die Autoren z.B. die Form der I-V-Beziehung der Gleichgewichtsströme. Die PLC-abhängige Aktivierung von TRPC5 stellt sich somit nicht als eine Verschiebung der spannungsabhängigen Leitfähigkeit des Kanals dar, sondern vielmehr als eine Ansammlung einer Subpopulation an Kanälen in einer der vier separaten Phasen. Es muss betont werden, dass diese Modellvorstellung in deutlichem Widerspruch zur aktuellen

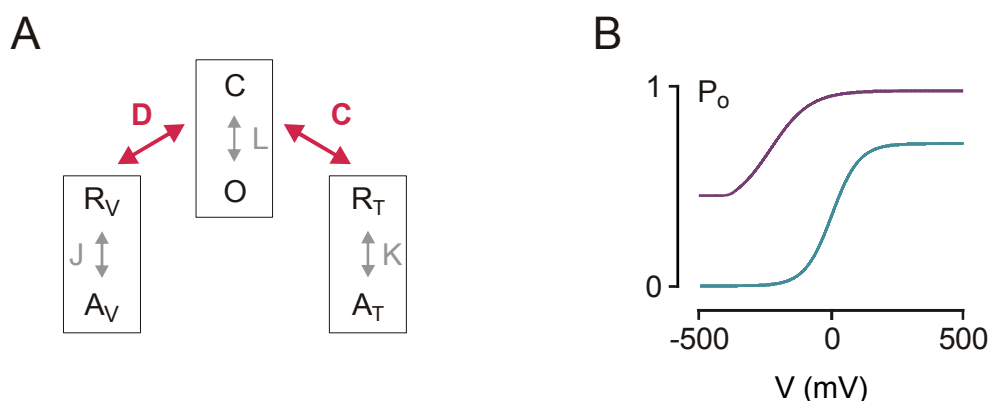


Abbildung 4.2: **Allosterisches Modell eines spannungsabhängigen Kanals.** A: Schema des allosterischen Modells für die spannungs- und temperaturabhängige Aktivierung von TRPM8 nach Matta (2007). Der Kanal registriert Änderungen im Membranpotential ( $V$ ) und in der Temperatur ( $T$ ) über zwei unabhängige Sensoren. Diese können in einem Ruhezustand ( $R_V$  bzw.  $R_T$ ) und einem aktivierten Zustand ( $A_V$  und  $A_T$ ) vorliegen und koppeln die verschiedenen Stimuli ( $V$  und  $T$ ) an Öffnungen und Schließungen des Kanals ( $C \leftrightarrow O$ ). Die acht Zustände des Kanals resultieren daraus, dass die Zustände der Sensoren  $R_V$ ,  $A_V$ ,  $R_T$  und  $A_T$  jeweils beim offenen oder geschlossenen Kanal möglich sind. Angewendet werden kann dieses Modell jedoch nur bei guter Datenlage (siehe Erklärungen im Text). B: Das Offenwahrscheinlichkeits-Spannungsdiagramm ( $P_o$ - $V$ -Beziehung) eines spannungsabhängigen Kanals ist eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die den stufenlosen Übergang der Aktivität in Abhängigkeit vom Membranpotential darstellt. Auch der (hypothetische) Übergang von der blauen in die violette  $P_o$ - $V$ -Beziehung z.B. durch einen Liganden erfolgt stufenlos in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden. Bei der violetten  $P_o$ - $V$ -Beziehung sind im Vergleich zur blauen sowohl  $V_{1/2}$  als auch  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  verändert. Solche Verschiebungen können mit einem in A abgebildeten Modell theoretisch vorausgesagt werden.

Lehrmeinung steht. Diese besagt, dass die Aktivität von Kanälen stufenlos durch einen entsprechenden Stimulus geändert wird. Der Grad der Aktivierung hängt von der Konzentration bzw. von der Energie (z.B. bei Temperatur oder Spannung) des Stimulus ab und kann durch Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 4.2B) wiedergegeben werden. Auch die oben diskutierte Verschiebung der g-V-Beziehungen von TRPC5 nach PLC-Stimulation (*Two-State-Model*) ist prinzipiell ein stufenloser Vorgang. Das Ausmaß der Verschiebung der g-V-Beziehung hängt von der Konzentration des (unbekannten) direkten Aktivators von TRPC5 ab, welcher in Abhängigkeit von PLC generiert wird. Gleiches gilt für ein allosterisches Modell, bei dem sich jedoch nicht nur  $V_{1/2}$ , sondern auch  $g_{\min}$  und  $g_{\max}$  in Abhängigkeit von der Konzentration des (noch unbekanntes) intrazellulären Liganden und vom Membranpotential stufenlos verändern. Trotz aller experimenteller Probleme bei der Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit von TRPC5 ist die Theorie der distinkten Phasen nach Obukhov & Nowycky (2008) kein hilfreicher Erklärungsansatz. Zum einen erlaubt diese Modellvorstellung keinen Vergleich der spannungsabhängigen Kenngrößen von TRPC5 mit denen anderer Kanäle. Zum anderen ist eine Vorhersage der Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential und der Konzentration anderer Stimuli (intrazelluläre Liganden) letztendlich nicht möglich. Letzteres kann nur mithilfe von kinetischen Modellen geschehen, die aus diesem Grund immer zur Beschreibung von spannungsabhängigen Kanälen verwendet werden sollten.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass auch die Aktivität von TRPC4 durch das Membranpotential modifiziert wird. Während der PLC-abhängigen Aktivierung des Kanals kam es, wie bei TRPC5, zu Veränderungen in den g-V-Beziehungen, die zum Teil auf eine Verschiebung von  $V'_{1/2}$  zu negativeren Spannungen zurückzuführen ist (siehe Kap. 3.2.3.1). Im Gegensatz zu den Strömen durch TRPC5 war die Leitfähigkeit von TRPC4 bei sehr negativen Potentialen (-160 mV) zu jedem Zeitpunkt der PLC-vermittelten Aktivierung nahe Null. Dies ließ vermuten, dass sich zumindest  $g_{\min}$  durch PLC-Stimulation nicht verändert. Bei der Determinierung der maximalen Leitfähigkeit stellten sich bei TRPC4 die gleichen Probleme wie bei TRPC5 ein. Eine Sättigung der g-V-Beziehungen war im untersuchten Spannungsbereich nicht ersichtlich. Dies lag auch hier an der großen Ausdehnung des  $Mg^{2+}$ -abhängigen Blocks von TRPC4, der auch bei +100 mV noch präsent zu sein schien. Prinzipiell können für TRPC4 jedoch ähnliche Aussagen wie für TRPC5 getroffen werden. Einerseits ist es sehr wahrscheinlich, dass die PLC-abhängige Aktivierung des Kanals an eine Verschiebung der g-V-Beziehungen zu negativeren Potentialen gekoppelt ist. Andererseits reicht auch bei TRPC4 ein einfaches *Two-State-Model* möglicherweise nicht aus, um alle Facetten des Gatings ausreichend zu beschreiben.

In glatten Muskelzellen des Darms (Meerschweinchen, Maus) wurden in mehreren Studien Rezeptor-operierte Ströme beschrieben (Zholos & Bolton, 1994, Zholos *et al.*, 2004, Dresviannikov *et al.*, 2006), welche in einer kürzlich erschienenen Studie TRPC4 zugeordnet werden konnten (Tsilovskyy *et al.*, 2009). Im Ganzzell-Modus weisen diese Ströme neben einer doppelt-rektifizierenden I-V-Beziehung und einem Umkehrpotential nahe 0 mV auch eine Spannungsabhängigkeit auf. Ähnlich der in Kapitel 3.2.3.1 gezeigten Leitfähigkeitskurven von TRPC4 (HEK293, Abb. 4.3) ist die Leitfähigkeit der Darm-Myozyten während PLC-Aktivierung bei sehr negativen Membranpotentialen (-160 mV) nahe 0 nS. Zwischen -160 mV und ca. -40 mV steigt die Myocyten-Leitfähigkeit dann kontinuierlich auf einen Maximalwert, und bei höheren Spannungen wird sie in negativer Weise beeinflusst, ein Effekt, der durch den  $Mg^{2+}$ -abhängigen Block von TRPC4 (Schaefer *et al.*, 2000) erklärt werden kann. Die Arbeiten an Darm-Myocyten belegen somit eindrucksvoll, dass im Überexpressionssystem gewonnene Charakteristika von Ionenkanälen überaus nutzvoll sind, um funktionelle Eigenschaften von primären Zellen oder Geweben erklären zu können.

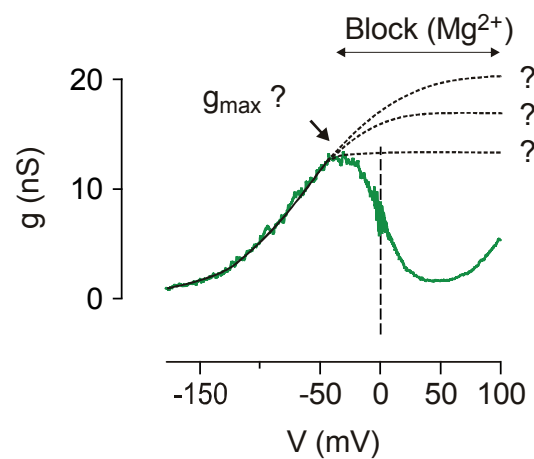


Abbildung 4.3: **Leitfähigkeits-Spannungs (g-V) -Beziehung von TRPC4.** Die abgebildete Kurve entstammt den Daten in Kapitel 3.2.4.1 und ähnelt den g-V-Beziehungen des Rezeptor-operierten Kanals aus Darm-Myozyten (Zholos & Bolton, 1994, Zholos & Bolton, 1997, Dresviannikov *et al.*, 2006). Die Kurve steigt zwischen -160 mV und ca. -40 mV kontinuierlich bis zu einem Maximum an, und fällt dann wieder ab. Der Abfall ab -40 mV kommt sehr wahrscheinlich durch den  $Mg^{2+}$ -abhängigen Block von TRPC4 zustande (Schaefer *et al.*, 2000). Dadurch ist völlig unklar, ob es sich beim Maximum-Wert bei ca. -40 mV wirklich um  $g_{max}$  handelt. Die gestrichelten schwarzen Linien deuten an, wie die g-V-Beziehung von TRPC4 ohne den Block aussehen könnte.

Der  $Mg^{2+}$ -abhängige Block überlagerte den sättigenden Teil der g-V-Beziehungen auch in den o.g. Arbeiten an Darm-Myocyten eindeutig, dennoch wurden dort die Maximalwerte bei ca. -40 mV als Werte für  $g_{max}$  herangezogen (Abb. 4.3, Zholos & Bolton, 1994, Zholos *et al.*, 2004, Dresviannikov *et al.*, 2006). Es erscheint jedoch zweifelhaft, dass diese Maximalwerte überhaupt eine theoretische Relevanz besitzen. Wahrscheinlicher ist, dass ein Anstieg der Leitfähigkeit bei ca. -40 mV

durch das Einsetzen des  $Mg^{2+}$ -abhängigen Blocks nur unterbrochen wird. Das „Maximum“ an dieser Stelle hat so keine theoretische Aussagekraft für ein Modell. Neben Ganzzellströmen wurden in diesen Arbeiten auch die Einzelkanalströme durch den Rezeptor-operierten Kanal der Darm-Myozyten untersucht. Die  $P_o$ -V-Beziehungen konnten so im Bereich von -120 mV bis +60 mV direkt bestimmt werden. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch die direkt ermittelten  $P_o$ -V-Beziehungen nicht in allen Fällen in eine Sättigung bei hohen Potentialen gelangten (Dresviannikov *et al.*, 2006). Somit steht das *Two-State-Model*, welches für die Spannungsabhängigkeit des Rezeptor-operierten Kanals aus Darm-Myozyten (TRPC4) benutzt wurde, auf keiner sicheren experimentellen Basis.

## 4.2. Effekte extrazellulärer Kationen auf Ströme durch TRPC5

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ionenzusammensetzung auf der extrazellulären Seite der Membran einen starken Einfluss auf die Aktivität von TRPC5 hat. Im Ganzzellmodus nahmen die G-Protein-aktivierten Ströme durch TRPC5 (bei -60 mV) bei leichter Reduktion des pH-Wertes von pH 7,4 auf 6,5 signifikant zu. Die Amplitude bei pH 6,5 war im Vergleich zu pH 7,4 etwa 2,5-fach erhöht (siehe Kap. 3.3.2.1). Potenzierungen in ähnlicher Größenordnung wurden auch beobachtet, wenn das extrazelluläre Natrium ( $Na^+$ ) gegen ein anderes Alkalimetall-Ion (entweder  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  oder  $Cs^+$ ) ausgetauscht wurde (siehe Kap. 3.4.4.1). Eine nähere Untersuchung dieser Effekte im *Outside-Out*-Modus ergab, dass sich sowohl bei der Senkung des extrazellulären pH-Wertes (von pH 7,4 auf 6,5) als auch beim Austausch von  $Na^+$  gegen ein anderes Alkalimetall-Ion die Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit jeweils drastisch erhöhte. Somit sind die potenzierenden Effekte einer veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Kationen durch eine Erhöhung der Aktivität (*Gating*) von TRPC5 zu erklären. Das *Gating*-Verhalten des Kanals wurde dabei jeweils durch eine Verlängerung der mittleren Offenzeiten (*mean open time*) und einer Zunahme an Öffnungsereignissen pro Zeitintervall (Frequenz) modifiziert (siehe Kap. 3.3.3 und Kap. 3.4.4.1.2). Interessanterweise potenzieren auch mikromolare Konzentrationen an Lanthanoiden ( $La^{3+}$  oder  $Gd^{3+}$ ) die Ströme durch TRPC5 auf eine ähnliche Weise wie  $H^+$  und Alkalimetall-Ionen (Jung *et al.*, 2003). Die Ähnlichkeiten der potenzierenden Effekte von  $H^+$  (pH 6,5), Alkalimetall-Ionen ( $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  oder  $Cs^+$ ) und Lanthanoiden ( $La^{3+}$  oder  $Gd^{3+}$ ) lassen vermuten, dass ihnen ein ähnlicher molekularer Mechanismus zugrunde liegt.

Parallel zur Erhöhung der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit (-60 mV) wurde durch die Reduktion des extrazellulären pH-Wertes (pH 6,5) und durch die Applikation

von  $\text{Gd}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) auch die Einzelkanalleitfähigkeit signifikant reduziert (siehe Kap. 3.3.3). Es ist daher anzunehmen, dass die inhibitorischen Effekte von  $\text{H}^+$  und  $\text{Gd}^{3+}$  im *Whole-Cell*-Modus auf einen Block der Ionenpermeation (hauptsächlich von  $\text{Na}^+$ ) zurückzuführen sind. Da sich das Umkehrpotential von TRPC5 während der Applikation von  $\text{H}^+$  oder  $\text{Gd}^{3+}$  jeweils nicht änderte, und die extrazellulären Konzentrationen an  $\text{H}^+$  (bei pH 6,5 lediglich 0,276  $\mu\text{M}$  höher als bei pH 7,4) bzw.  $\text{Gd}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) um mehrere Größenordnungen kleiner waren als die aller anderen Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ : 140 mM), ist eine nennenswerte Permeation dieser Ionen durch TRPC5 jedoch nicht wahrscheinlich. Im Fall von  $\text{Li}^+$  (140 mM), das im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  appliziert wurde, verschob sich jedoch das Umkehrpotential, was auf seine Passage durch den Kanal zurückzuführen ist. Die geringere Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5 in  $\text{Li}^+$  im Vergleich zu  $\text{Na}^+$  erklärt sich also durch die unterschiedlichen Permeationseigenschaften der beiden Alkalimetall-Ionen. Diese werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

TRPC4 weist innerhalb der TRP-Familie die größten Sequenzähnlichkeiten zu TRPC5 auf. Auch die Ströme durch TRPC4 werden durch leichte Reduktionen des extrazellulären pH-Wertes (pH 6,5) potenziert (siehe Kap. 3.3.5). Die Potenzierung von TRPC4 durch Lanthanoide ist bereits seit längerem bekannt (Schaefer *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurden Ganzzellströme durch TRPC6 weder durch die Senkung des extrazellulären pH-Wertes noch durch den Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  potenziert. Stattdessen fand in allen Fällen eine Inhibition der Ströme statt. Bei  $\text{H}^+$  war diese konzentrationsabhängig mit einem  $\text{pIC}_{50}$  von 5,7 (bei -60 mV, siehe Kap. 3.3.5). Durch den Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen ein anderes Alkalimetall-Ion wurden die Ströme durch TRPC6 nur leicht inhibiert. Ein vergleichbarer Effekt trat auch bei TRPC3 auf (siehe Kap. 3.4.5). Dies zeigt, dass die potenzierenden Effekte von  $\text{H}^+$  und Alkalimetall-Ionen auf die Aktivität von TRPC5 spezifisch ist und selbst bei relativ ähnlichen Kanälen nicht zwangsläufig stattfinden. Gleiches wurde auch für mikromolare Konzentrationen an Lanthanoiden gezeigt, welche sowohl TRPC3 als auch TRPC6 ausschließlich blockieren (Zhu *et al.*, 1998, Halaszovich *et al.*, 2000, Inoue *et al.*, 2001, Jung *et al.*, 2003). An der Potenzierung von TRPC5 durch Lanthanoide sind zwei Glutamatreste beteiligt (Jung *et al.*, 2003). Einer von ihnen ist nahe TM5 (E543) lokalisiert, der andere befindet sich an erster Position in einem EFTE-Motiv, das sich nahe TM6 befindet (E595). An ähnlichen Positionen kommen in TRPC4 ebenfalls Glutamatreste vor, in TRPC3 und TRPC6 sind diese jedoch an den entsprechenden Stellen nicht vorhanden. Die Anwesenheit bzw. das Fehlen dieser Aminosäuren passt demnach zum Auftreten von potenzierenden Effekten durch Lanthanoide bei den verschiedenen TRPC-Isoformen.

Die Potenzierung von TRPC5 durch  $H^+$  und Alkalimetall-Ionen ähnelt auffallend den Effekten von Lanthanoiden. Zugleich konnten potenzierende Effekte dieser Kationen nur bei TRPC4 und TRPC5 beobachtet werden, welche Glutamatreste an den entsprechenden Positionen nahe TM5 und TM6 besitzen. Somit scheinen diese Aminosäuren eine Schlüsselrolle auch bei der Determination der Effekte von  $H^+$  und Alkalimetall-Ionen einzunehmen. Interessanterweise hat TRPV1 ebenfalls Glutamatreste an analogen Stellen (E600 und E648), wobei der distale wie bei TRPC4 und TRPC5 in einem EFTE-Motiv lokalisiert ist. Auch TRPV1 wird sowohl durch  $H^+$  (Caterina *et al.*, 1997, Tominaga *et al.*, 1998, Jordt *et al.*, 2000), durch Lanthanoide (Tousova *et al.*, 2005) als auch durch Alkalimetall-Ionen (Ahern *et al.*, 2005) potenziert, und die Aminosäuren E600 und E648 sind an diesen Effekten beteiligt.

Um den Mechanismus der Potenzierung von TRPC5 durch extrazelluläre Kationen besser zu verstehen, wurden in einer Serie von Experimenten die Punktmutanten TRPC5-E543Q und TRPC5-E595Q untersucht. Die Neutralisation des proximalen Glutamatrestes (E543) führte dabei zu einem funktionellen Kanal, der eine signifikant höhere Aktivität als der Wildtyp aufwies (siehe Kap. 3.3.4.1). Experimente im *Outside-Out*-Modus zeigten, dass nicht die Einzelkanalamplitude, sondern die Offenwahrscheinlichkeit der Mutante TRPC5-E543Q erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass eine negative Ladung an Position 543 einen regulatorischen Effekt auf die Aktivität von TRPC5 hat. Im Gegensatz dazu waren die *Whole-Cell*-Ströme durch TRPC5-E595Q signifikant kleiner als beim Wildtyp, was auf eine deutlich reduzierte Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit zurückgeführt werden konnte. In *Outside-Out*-Experimenten war die Aktivität von TRPC5-E595Q sogar derart gering, dass eine statistische Analyse der Öffnungseignisse nicht möglich war (siehe Kap. 3.3.4.2). Interessanterweise wies diese Mutante auch eine veränderte Einzelkanalleitfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp auf. Da diese jedoch größer war als beim Wildtyp, ist sie offensichtlich nicht der Grund für die verringerten Ganzzellströme durch TRPC5-E595Q.

Die Reduktion des extrazellulären pH-Wertes (auf pH 6,5, siehe Kap. 3.3.4) oder der Austausch des extrazellulären  $Na^+$  gegen ein anderes Alkalimetall-Ion (siehe Kap. 3.4.4.2.2 und 3.4.4.2.3) führte bei beiden Mutanten, TRPC5-E543Q und -E595Q, zu Potenzierungen der Ganzzellströme. Anders als beim Wildtyp waren diese Effekte im Fall von TRPC5-E543Q jedoch nur bei den basalen Strömen ohne Ausnahme zu beobachten. Die mit  $GTP\gamma S$  aktivierten Ströme durch TRPC5-E543Q wurden hingegen bei pH 6,5 und beim Austausch von  $Na^+$  gegen  $Li^+$  inhibiert. Dieser Effekt hängt offenbar mit der Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit zusammen, die durch  $H^+$  und  $Li^+$  bei TRPC5-wt und TRPC5-E543Q gleichermaßen hervorgerufen wurde. Da die Mutante eine erhöhte Aktivität (bei pH 7,4 und in  $Na^+$ ) aufwies, dominierte nach PLC-Stimulation offenbar die Inhibition der Ionen-

permeation über die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit. Der letztere Effekt konnte bei den basalen Strömen durch TRPC5-E543Q im *Outside-Out*-Modus bestätigt werden (siehe Kap. 3.3.4.2 und 3.4.4.2.2). Beim Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  fiel die Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit nur etwa halb so groß aus wie beim Wildtyp, und bei der Reduktion des extrazellulären pH-Wertes auf pH 6,5 war der Effekt nicht signifikant. Somit lassen sich die insgesamt geringeren potenzierenden Effekte von Alkalimetall-Ionen und  $\text{H}^+$  auf TRPC5-E543Q durch seine erhöhte Aktivität unter den Standard-Bedingungen ( $\text{Na}^+$ , pH 7,4) erklären. Hierdurch fällt die relative Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit geringer aus als beim Wildtyp.

Im Fall von TRPC5-E595Q war eine Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit im *Outside-Out*-Modus aufgrund seiner zu geringen Aktivität nicht möglich. Eine Potenzierung dieser Mutante durch  $\text{H}^+$  und den Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen ein anderes Alkalimetall-Ion war jedoch im Ganzzellmodus sowohl bei den basalen als auch bei den PLC-stimulierten Strömen zu beobachten. Die geringe Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5-E595Q zeigt, dass die mutierte Aminosäure generell eine Rolle für die Aktivität von TRPC5 spielt. Auch der zweite Glutamatrest im EFTE-Motiv, E598, scheint wichtig für die Aktivität des Kanals zu sein. Die Punktmutante TRPC5-E598Q wies wie E595Q eine deutlich reduzierte Offenwahrscheinlichkeit auf, und konnte im Ganzzellmodus ebenfalls durch extrazelluläre Kationen ( $\text{H}^+$ : siehe Kap. 3.3.4.2 und  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  bzw.  $\text{Cs}^+$ : siehe Kap. 3.4.4.2) potenziert werden. Dass die potenzierenden Effekte von extrazellulären Kationen auf die Aktivität von TRPC5 durch keine der Punktmutationen (E543Q, E595Q, E598Q) komplett verhindert werden konnten, deutet auf einen komplizierten Mechanismus und die Beteiligung weiterer Aminosäuren an diesen Effekten hin. Ein möglicher Erklärungsansatz für die potenzierende Wirkung von extrazellulären Kationen auf Ströme durch TRPC5 liegt in einer inhibitorischen Bindung von  $\text{Na}^+$  an den Kanal. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die Potenzierung von TRPV1 durch extrazelluläre Kationen postuliert (Ohta *et al.*, 2008). Der Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  führte jeweils zu deutlichen Erhöhungen der Aktivität von TRPC5, was an der Aufhebung einer inhibitorischen Bindung des Kations liegen könnte. Alternativ könnte auch eine „potenzierende“ Bindungsstelle existieren, die für alle Alkalimetall-Ionen deutlich besser zugänglich ist als für  $\text{Na}^+$ . Die Existenz einer Bindungsstelle mit solchen Eigenschaften erscheint jedoch wenig schlüssig, da die Eigenschaften (z.B. Elektronegativität, Ionenradius) von  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  sehr unterschiedlich sind und kein wirkliches Ausschlusskriterium für  $\text{Na}^+$  existiert. Eine Aminosäure, die möglicherweise in eine  $\text{Na}^+$ -spezifische, „inhibitorische“ Bindungsstelle involviert ist, könnte der Glutamatrest E543 sein. Die Neutralisierung seiner Seitenkette (E543Q) führte zu einer signifikant erhöhten Aktivität von TRPC5, was möglicherweise in einer schwächeren Bindung von  $\text{Na}^+$  begründet ist.

Im Gegensatz dazu ist die Beteiligung der Glutamatreste E595 und E598 an einer inhibitorischen Bindungsstelle für  $\text{Na}^+$  weniger wahrscheinlich, denn die Punktmutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q wiesen in  $\text{Na}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen jeweils eine deutlich geringere Offenwahrscheinlichkeit als der Wildtyp auf.

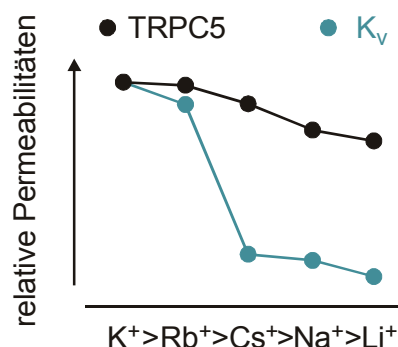
### 4.3. Ionenpermeation durch TRPC5

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Ionenpermeation durch TRPC5 mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik. Die Analyse der Umkehrpotentiale von TRPC5 mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  auf der extrazellulären Seite der Membran ergab, dass die Permeation von monovalenten Kationen durch den Kanal mithilfe der Nernst-Gleichung erklärt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass diese Ionen bei der Permeation nur sehr schwache Bindungen mit dem Kanal eingehen und mit sich selbst kaum interagieren (Unabhängigkeit). Im Gegensatz dazu zeigte  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Permeation deutliche Abweichungen vom Unabhängigkeitsprinzip, was auf mindestens eine Bindungsstelle für dieses Kation in der Pore von TRPC5 hindeutete. TRPC5 wurde als leicht selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{30\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 3,8$ ) und  $\text{Mg}^{2+}$  ( $P_{30\text{Mg}}/P_{\text{Na}} \sim 1,8$ ) gegenüber  $\text{Na}^+$  charakterisiert. Die relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen folgten der Sequenz  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+$ , was der Eisenmann-Reihe IV entspricht. Die elf von Eisenmann (1962) postulierten Reihen geben Hinweise darauf, wie groß die Feldstärke des Selektivitätsfilters ist. Das elektrische Feld kommt dabei aufgrund geladener und polarer Gruppen zustande, die zur Pore gerichtet sind (siehe Kap. 2.4.2.2). Eisenmann-Reihe IV bedeutet eine relativ schwache Feldstärke des Selektivitätsfilters von TRPC5.

Im Hinblick auf die Ionenpermeation weist TRPC5 deutliche Ähnlichkeiten mit anderen unselektiven Kationenkanälen aus der TRP-Familie auf (Owsianik *et al.*, 2005). Der bisher am ausführlichsten untersuchte, unselektive TRP-Kanal ist TRPV4 (Voets *et al.*, 2002). Dieser Kanal ist ebenfalls schwach selektiv für divalente Kationen und seine relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen folgen der Eisenmann-Sequenz IV. Auch für weitere unselektive TRP-Kanäle wurde bereits eine schwach bevorzugte Permeation von divalenten gegenüber monovalenten Kationen beschrieben (z.B. TRPV1-3, TRPC3/6/7, Caterina *et al.*, 1997, Hofmann *et al.*, 1999, Kamouchi *et al.*, 1999, Kanzaki *et al.*, 1999, Voets *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2002, Owsianik *et al.*, 2005). Jedoch sind die relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen bei den meisten (unselektiven) TRP-Kanälen bisher unvollständig untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit



wurden diese bei TRPC3 und TRPC6 für alle Alkalimetall-Ionen charakterisiert. Die Permeabilitäten folgten jeweils der Sequenz  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+$ , und somit der Eisenmann-Reihe III. Diese Sequenz spricht für eine schwache Feldstärke des Selektivitätsfilters für monovalente Kationen in TRPC3 und TRPC6 und ähnelt den Werten bei TRPC5. Im Gegensatz zu TRPC3/6 und TRPC5 kommen größere Feldstärken (Eisenmann-Reihen hohen Grades) bei Kanälen vor, bei denen vorwiegend geladene Aminosäuren (starkes elektrisches Feld) am Selektivitätsfilter beteiligt sind. Dies ist insbesondere bei  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kanälen der Fall. Der Selektivitätsfilter bei spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wird durch einen Ring von vier Glutamatresten gebildet, die im Inneren der Pore lokalisiert sind (Sather & McCleskey, 2003). Aufgrund dieser hohen Ladungsdichte existiert ein starkes elektrisches Feld, und monovalente Kationen permeieren in Abwesenheit von divalenten Kationen entsprechend der Eisenmannreihe XI durch diese Kanäle (Hess *et al.*, 1986). Bei den beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven TRP-Kanälen TRPV5 und TRPV6 folgen die relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen der Eisenmann-Reihe X (Hoenderop *et al.*, 2001). Bei TRPV5 wurde die Beteiligung negativer Seitenketten (Aspartatrest D542) am Selektivitätsfilter bereits gezeigt (Nilius *et al.*, 2001), und in TRPV6 existiert an analoger Position ebenfalls ein Aspartatrest (D541). Prinzipiell geben die Feldstärken (Eisenmann-Reihen) jedoch keine Auskünfte darüber, wie selektiv ein Kanal für ein bestimmtes monovalentes Kation ist. Spannungsabhängige Kaliumkanäle aus dem Tintenfischaxon ( $\text{K}_v\text{s}$ ) haben z.B., wie TRPC5 oder TRPV4, eine Permeabilitätssequenz gemäß der Eisenmann-Reihe IV ( $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ) (Edwards, 1982), was eine niedrige Feldstärke des Selektivitätsfilters ausdrückt. Dies passt zu der Vorstellung, dass monovalente



**Abbildung 4.4: Relative Permeabilitäten von TRPC5 und spannungsabhängigen Kaliumkanälen ( $\text{K}_v$ ) für Alkalimetall-Ionen.** Die relativen Permeabilitäten beider Kanäle folgen der Eisenmannreihe IV ( $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ). Die hohe Selektivität von  $\text{K}_v\text{s}$  für  $\text{K}^+$  (und  $\text{Rb}^+$ ) resultiert aus den sehr niedrigen Permeabilitäten für  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$ . Der unselektive Kationenkanal TRPC5 hingegen zeigte für alle Alkalimetall-Ionen ähnlich hohe Permeabilitäten. Daten für  $\text{K}_v$  aus Edwards (1982), Werte jeweils normiert auf die Kalium-Permeabilität des entsprechenden Kanals.

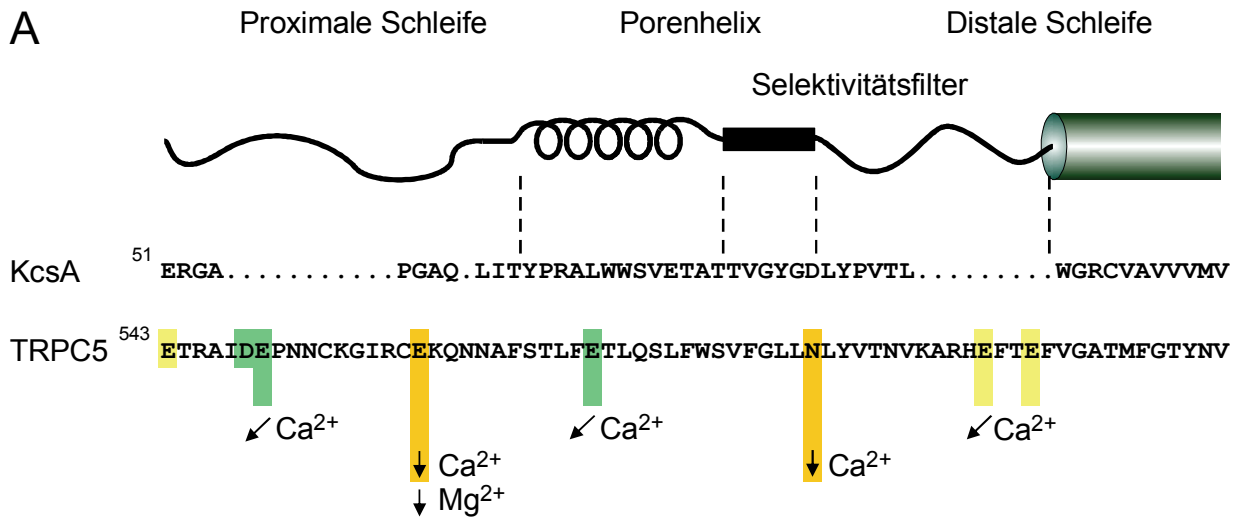
Kationen hauptsächlich über die (polaren) Sauerstoffatome des Proteinrückgrates mit der Pore des Kanals interagieren (Doyle *et al.*, 1998, Sather & McCleskey, 2003). Die hohe Selektivität der  $K_v$ s drückt sich hingegen in den deutlich geringeren Permeabilitäten für  $Cs^+$ ,  $Na^+$  und  $Li^+$  im Vergleich zu  $K^+$  und  $Rb^+$  aus (Abb. 4.4). Im Fall der hier untersuchten Kanäle TRPC3, TRPC5 und TRPC6 zeigen demnach die Zahlenwerte der relativen Permeabilitäten ( $\sim 1$ ) die schwache Selektivität für monovalente Kationen an. Die Permeabilitätssequenzen für monovalente Kationen - Eisenmann-Reihe III bzw. IV - deuten darauf hin, dass am Selektivitätsfilter dieser Kanäle nur eine geringe Ladungsdichte existiert.

Um ein besseres Verständnis der Ionenpermeation durch TRPC-Kanäle zu erlangen, wurde die Porenregion von TRPC5 (Region zwischen TM5 und TM6) näher analysiert. Wie Röntgenstrukturanalysen zeigen, haben die Porenregionen von Kationenkanälen prinzipielle, strukturelle Gemeinsamkeiten (siehe Kap. 1.3.3 und Abb. 4.5A). Der Selektivitätsfilter kleidet den engsten Bereich der Pore aus. Polare oder geladene Gruppen in der Region des Selektivitätsfilters haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Ionenpermeation. Ein Sequenzvergleich der Porenregionen von TRPC5 mit der von bakteriellen Kationenkanälen (KcsA,  $K_v$ AP, NaK) machte jedoch große Unterschiede in diesen Bereichen deutlich. Während die Region zwischen TM5 und TM6 bei TRPC5 56 Aminosäuren (AS) umfasst, ist sie bei bakteriellen Kanälen mit jeweils weniger als 30 AS deutlich kürzer. Aus diesem Grund war eine Vorhersage der Tertiärstruktur der TRPC5-Pore basierend auf den Kristallstrukturen von bakteriellen Kanälen nicht möglich. Aus dem Sequenzvergleich von TRPC5 mit bakteriellen  $K^+$ -Kanälen gingen jedoch auch Übereinstimmungen hervor, die interessanterweise in der Region des vermeintlichen Selektivitätsfilters auftraten. Beim  $K^+$ -Kanal aus *Streptomyces lividans* (KcsA) bilden die Sauerstoffatome des Proteinrückgrates in einem TVGYGD-Motiv (AS 75 bis 80) den Selektivitätsfilter (Abb. 4.5A, Doyle *et al.*, 1998). In TRPC5 existiert ein ähnliches Motiv (\*FGLLN, AS 580 bis 584, siehe Kap. 3.4.2.1) im Bereich zwischen TM5 und TM6. Dass diese Region tatsächlich an der Ionenpermeation beteiligt sein könnte, zeigten Experimente an der Mutante TRPC5-N584D. Die Mutation des Asparaginrestes N584 veränderte deutlich den Verlauf der I-V-Beziehungen von TRPC5, welche eher denen von TRPC3 oder TRPV4 ähnelten als denen von TRPC5 (Wildtyp). Zusätzliche Evidenz für eine Beteiligung von N584 an der Ionenpermeation durch TRPC5 gab ein Sequenzvergleich des Kanals mit TRPC3 und TRPV4. Diese besitzen an analogen Positionen zu N584 jeweils negative Ladungen (TRPC3-E630 und TRPV4-D682), und im Fall von TRPV4 wurde eine Beteiligung dieser negativen Ladung an der Permeation bereits gezeigt (Voets *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigte die Mutante TRPC5-N584D auch eine signifikant erhöhte Permeabilität für  $Ca^{2+}$ . Dies passt ebenfalls zu den Daten von TRPV4, bei dem die Neutralisation des ent-

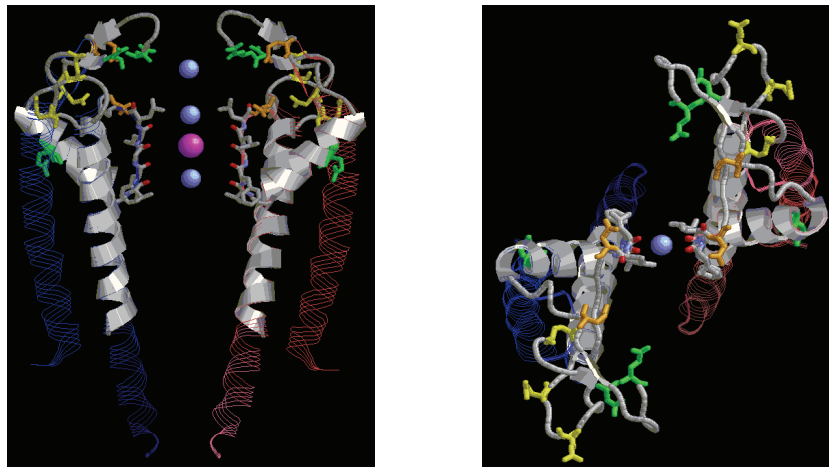
sprechenden Rests zu einer Abschwächung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität führte (Voets *et al.*, 2002). Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Region um N584 den Selektivitätsfilter von TRPC5 darstellt und dabei ähnlich aufgebaut ist wie bei bakteriellen Kationenkanälen (Abb. 4.5A und B). In der Literatur gibt es zur vermeintlichen Position des Selektivitätsfilters von TRPC5 derzeit unterschiedliche Angaben, wobei jedoch in keiner der Arbeiten TRPC5 selbst funktionell untersucht wurde. Owsianik *et al.* (2005) vermuten den Selektivitätsfilter im Bereich von V590 bis E595, eine Annahme, die fast ausschließlich auf einem multiplen Alignment von KcsA mit klassischen TRP-Kanälen basiert. Da sich, wie oben bereits erwähnt, die Aminosäuresequenzen von TRPC5 und KcsA im Porenbereich deutlich unterscheiden, ist die Evidenz für diese eher distale Lage des Selektivitätsfilters jedoch gering. In einer anderen Arbeit wurde der TRP-Kanal aus *Drosophila* (dmTRP) funktionell untersucht und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivitätsfilter am Aspartatrest D621 lokalisiert (Liu *et al.*, 2007). Da diese Position analog zu N584 in TRP5 ist, stehen die Daten klar im Einklang mit den experimentellen Befunden der vorliegenden Arbeit.

Weil die Porenregion von TRPC5 fast doppelt so lang ist wie bei den bakteriellen Kationenkanälen mit bekannter Röntgenstruktur (Abb. 4.5A), könnten strukturell auch noch weitere Bereiche ausgeformt sein, die für die Permeation wichtig sind. In einem Ansatz zur Identifikation weiterer Aminosäuren, die an der Ionenpermeation durch TRPC5 beteiligt sind, wurden daher alle negativ geladenen Reste zwischen TM5 und TM6 untersucht. Durch die Einführung konservativer Punktmutationen (E→Q, D→E) wurden diese jeweils einzeln neutralisiert. Von den generierten Mutanten unterschied sich TRPC5-E559Q besonders stark vom Wildtyp, da dieser Kanal fast impermeabel für divalente Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) war. Die Permeabilitäten monovalenter Kationen blieb hingegen im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert, was darauf hindeutet, dass es durch die Mutation nicht zu gravierenden Änderungen der Tertiärstruktur des Kanals kommt. Es liegt somit nahe, dass die negative Ladung dieses Glutamats in der Pore von TRPC5 eine Bindungsstelle für divalente Kationen darstellt. Interessanterweise beschreiben Liu *et al.* (2003) ähnliche Effekte bei TRPC1, wenn die negative Ladung an analoger Position ausgetauscht (E576K) wird. In L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wird der Selektivitätsfilter von Glutamatresten gebildet, deren negative Seitenketten  $\text{Ca}^{2+}$  binden können. Die Mutation dieser Reste führt zu Kanälen, die fast impermeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  sind, aber monovalente Kationen weiterhin passieren lassen (Ellinor *et al.*, 1995). Auch im Fall des  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven TRP-Kanals TRPV5 wird der Selektivitätsfilter durch negativ geladene Seitenketten gebildet (D542), deren Neutralisation die Permeation von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Kanal verhindert (Nilius *et al.*, 2001). Sequenzvergleiche mit bakteriellen Kationenkanälen legen jedoch nahe, dass die Position des Glutamatrests E559 von TRPC5 nicht mit der Position des Selektivitätsfilters

übereinstimmt (Abb. 4.5). In Anbetracht der bisher angestellten Überlegungen (siehe oben) sollte sich dieser im Bereich um N584 befinden. Die mutmaßliche Lage des Glutamatrestes E559 befindet sich sehr weit proximal davon, sogar vor der mutmaßlichen Porenhelix, und müsste demnach eher in der Region des äußeren Vestibüls liegen. Es erscheint überraschend, dass die Neutralisation einer



**B**



**Abbildung 4.5: Strukturvergleich der Porenregionen von TRPC5 und KcsA.** A: Sequenzvergleich der Primärsequenzen von KcsA und TRPC5 im Bereich der Pore (manuelles Alignment). *Oben*, Sekundärstruktur der Porenregion von KcsA. *Unten*, Veränderungen der relativen Permeabilitäten für divalente Kationen bei den untersuchten TRPC5-Mutanten (jeweils E→Q, D→N, N→D) im Vergleich zum Wildtyp. B: Mögliche Tertiärstruktur von TRPC5 (Ribbon) im Bereich der Pore basierend auf dem in A gezeigten, manuellen Sequenzvergleich. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren sind wie in A eingefärbt. Die Röntgenstruktur von zwei KcsA-Monomeren ist in blau und pink in der Strand-Darstellung abgebildet (nach Doyle *et al.*, 1998). Die blauen Kugeln symbolisieren Na<sup>+</sup>, die violette Kugel Cs<sup>+</sup>. *Links*, Frontalansicht. *Rechts*, Blick von der extrazellulären Seite der Membran auf die Porenregion. Man beachte, dass die tatsächliche Struktur von TRPC5 von der hier gezeigten abweichen könnte.

Ladung, die so weit außerhalb des mutmaßlichen Selektivitätsfilters liegt, solch deutliche Effekte auf die Ionenpermeation ausüben kann. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass am äußeren Rand der Pore eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$  existiert, an der E559 beteiligt ist, und die den Eintritt der divalenten Kationen in den Kanal determiniert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für eine intrazellulär lokalisierte Aminosäure in TRPC5 (D633) postuliert, die durch ihre Lage am inneren Porenmund die Permeation von  $\text{Mg}^{2+}$  durch den Kanal beeinflusst (Obukhov & Nowycky, 2005). Eine andere denkbare Erklärung für den Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ -Permeabilität in TRPC5-E559Q könnte sein, dass der Selektivitätsfilter von TRPC5 tatsächlich in der Region um E559 lokalisiert ist. Diese Möglichkeit wird jedoch eindeutig nicht durch Sequenzvergleiche mit anderen Kanälen gestützt: Erstens zeigt der Bereich um TRPC5-E559 (im Gegensatz zum Bereich um N584) fast keine Übereinstimmungen mit den Selektivitätsfiltern von bakteriellen Kationenkanälen. Zweitens würde sich die Frage stellen, welche mögliche Position innerhalb der Pore der Asparaginrest N584 einnimmt, für dessen räumliche Nähe zum Permeationsweg ebenfalls funktionelle Evidenz existiert. Mit einem Selektivitätsfilter um den Glutamatrest E559 würde N584 in einer ca. 40 AS langen, distalen „Schleife“ liegen. Da diese Schleife bei bakteriellen Kationenkanälen jedoch jeweils nur 4 - 6 AS lang ist (z.B. Doyle *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2006), ist die Voraussage der Tertiärstruktur eines solch langen Bereiches in TRPC5 nicht möglich. Ein weiteres Argument gegen eine Lokalisation von E559 in der Nähe des Selektivitätsfilters stellen die Experimente zum Umkehrpotential dar (siehe Kap. 3.4.1). Diese ergaben für  $\text{Mg}^{2+}$  konzentrationsunabhängige Permeabilitäten, was klar gegen eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstelle, die der Glutamatrest E559 ganz offensichtlich darstellt, innerhalb der Pore von TRPC5 spricht. Letztendlich kann die Frage, wie die für die Ionenpermeation relevanten Aminosäuren E559 und N584 in TRPC5 räumlich angeordnet sind, mit den vorliegenden Daten nicht vollständig beantwortet werden. In der Summe sprechen jedoch mehr Indizien dafür, dass der Selektivitätsfilter von TRPC5 im Bereich um N584 lokalisiert ist.

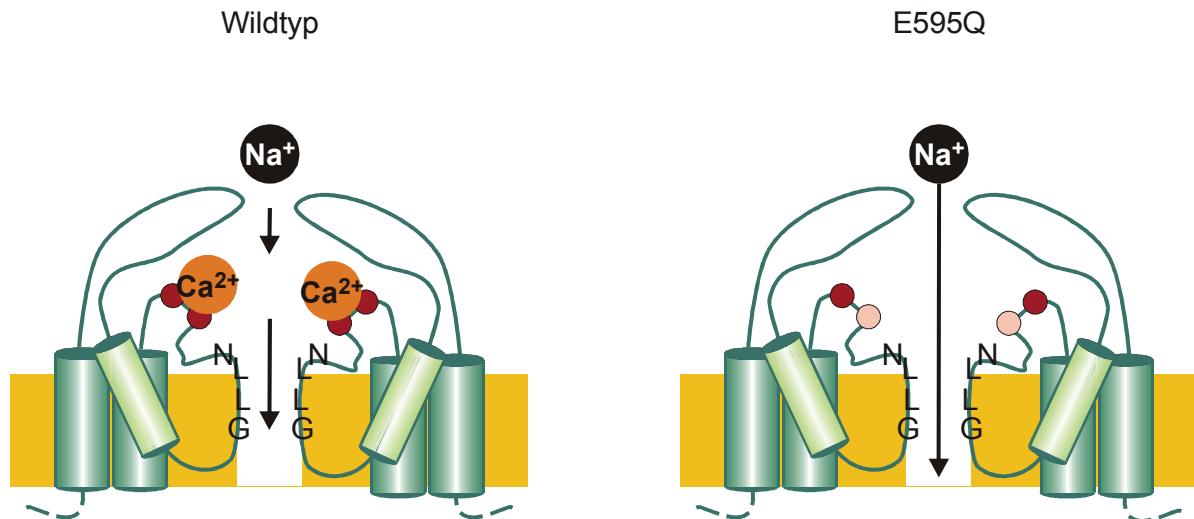
Die Neutralisation der Glutamatreste E549 und E570 (E→Q) führte zu einer verminderten Permeabilität von TRPC5 für  $\text{Ca}^{2+}$ , nicht jedoch für  $\text{Mg}^{2+}$ . Die Effekte waren somit weitaus schwächer ausgeprägt als bei der Mutation von E559. Der Vergleich mit anderen Kationen-selektiven Kanälen platziert die beiden Glutamatreste in die proximale Schleife (E549) bzw. in die Porenhelix (E570, Abb. 4.5). Es erscheint möglich, dass E549 und E570 ebenfalls durch Anbieten von Bindungsstellen an der Permeation divalenten Kationen durch TRPC5 beteiligt sind. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Mutation dieser Reste indirekt den Ionenflux durch TRPC5 beeinflusst. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine leichte Reduktion der elektrischen Feldstärke in der Pore durch die Neutralisation der Ladungen sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten erlauben keine eindeutigen

Aussagen über den Einfluss von E549 und E570 auf die Ionenpermeation durch TRPC5. Zukünftige Studien werden zunächst klären müssen, ob die negativen Seitenketten der Glutamatreste E549 und E570 in die Pore gerichtet sind oder nicht. In der distalen Schleife der Porenregion von TRPC5 ist ein EFTE-Motiv lokalisiert, in dem sich die beiden Glutamatreste E595 und E598 befinden. Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, führte die Neutralisation von einem der beiden Reste jeweils zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität von TRPC5. Zusätzlich zu diesem Effekt fielen die Punktmutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q jedoch auch durch eine veränderte Ionenpermeation auf. Zum einen hatten beide Mutanten signifikant höhere Permeabilitäten für  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 5,9$ ) als der Wildtyp (3,8). Zum anderen folgten die relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen mit  $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+$  einer Sequenz, die keiner der elf Eisenmann-Reihen entspricht. Beide Effekte resultieren weitestgehend aus den absoluten Umkehrpotentialen der Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q in  $\text{Na}^+$ -basierten extrazellulären Lösungen, welche signifikant negativer waren als beim Wildtyp (siehe Kap. 3.4.3.1 und Kap. 3.4.4.2.1). Die Evidenz für einen funktionellen Zusammenhang dieser negativen Umkehrpotentiale in  $\text{Na}^+$  und den Mutationen ist jedoch eher schwach. Durch die sehr niedrige Aktivität von TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q gerade in  $\text{Na}^+$ -basierten Lösungen könnten Veränderungen in den Umkehrpotentialen auch durch einen größeren Einfluss von endogenen Strömen oder durch Leckströme hervorgerufen werden. Dass die Glutamatreste E595 und E598 tatsächlich in die Ionenpermeation von TRPC5 involviert sind, zeigten *Outside-Out*-Experimente mit den Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q. Diese zeichneten sich durch eine deutlich größere Leitfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp aus, was auf eine veränderte Ionenpermeation hindeutet. In extrazellulären Lösungen mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  waren diese bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp jeweils etwa 1,5-fach erhöht. Weil sich die Leitfähigkeit mit verschiedenen Alkalimetall-Ionen auf der extrazellulären Seite ähnlich verhielt wie beim Wildtyp, lag die Vermutung nahe, dass entweder  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  über eine Interaktion mit E595 und E598 die Permeation monovalenter Kationen blockieren könnte. Ein solcher Effekt würde sich durch verschiedene Mechanismen erklären lassen. Zum einen könnte eine hochaffine Bindungsstelle (unter Beteiligung von E595 und E598) für divalente Kationen in der Kanalpore existieren, die von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  okkupiert wird. Eine starke Bindung dieser Ionen verlangsamt ihren Austritt aus dem Kanal und behindert den Eintritt weiterer Ionen in die Pore. Dadurch würde der Ionenflux, und damit die Einzelkanalleitfähigkeit, verringert werden. Mechanismen wie dieser sind an nahezu allen bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kanälen beschrieben worden. Die hochaffine Bindungsstelle wird bei diesen Kanälen von den Glutamatresten des Selektivitätsfilters für  $\text{Ca}^{2+}$  gebildet (Ellinor *et al.*, 1995, Sather & McCleskey, 2003). Im Fall von TRPC5 deuten die Daten jedoch

nicht auf eine Beteiligung von E595 oder E598 am  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivitätsfilter hin. Zum einen würde man hierbei eine Verminderung der Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Neutralisation der negativen Seitenketten erwarten. Zu beobachten war jedoch eine Erhöhung der  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ -Werte. Zum anderen sind die Glutamatreste E595 und E598 in Bezug auf die Porenregion von TRPC5 sehr distal lokalisiert. Die bisher diskutierten Ergebnisse sprechen dafür, dass sich der Selektivitätsfilter von TRPC5 um die Position N584 bzw. sogar noch weiter proximal (E559) befindet. Ein Mechanismus, der einen Block der monovalenten Ströme durch divalente Kationen an den Glutamatresten E595 und E598 erklären würde, wäre eine elektrostatische Abstoßung der Ionen am Eingang der Pore. Dieses Modell passt zu einer mutmaßlichen Position der beiden Aminosäuren am Rand des Porenmundes, die bereits in einer früheren Studie vermutet wurde (Jung *et al.*, 2003). Jung *et al.* konnten zeigen, dass Lanthanoide ( $\text{La}^{3+}$ ) bei der Doppelmutante TRPC5-E595Q/E598Q eine Reduktion der Einzelkanalamplitude hervorrufen, die sich im Unterschied zum Wildtyp durch ein deutliches Rauschen (*flickery block*) auszeichnet. Dieser Effekt könnte auftreten, weil die negativen Ladungen von E595 bzw. E598 beim Wildtyp den Eintritt von Lanthanoiden in die Pore aufhalten (Abb. 4.6). Wird dies durch die Neutralisation der Glutamatreste verhindert, gelangen die Lanthanoide in die Pore, durch die sie jedoch nicht permeieren können. Der „flickery block“ kommt dadurch zustande, dass  $\text{Na}^+$  (bzw. andere permeierende Ionen) erst dann durch TRPC5 transportiert werden können, wenn  $\text{La}^{3+}$  durch Diffusion (ungerichtet) die Pore wieder verlässt. Beim Wildtyp hingegen inhibiert das an E595/E598 gebundene  $\text{La}^{3+}$  den Eintritt der permeierenden Ionen durch elektrostatische Abstoßung und führt so nur zur Reduktion der Leitfähigkeit (Abb. 4.6). Die vergrößerten Einzelkanalamplituden bei den Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q könnten analog durch die Interaktion der Glutamatreste des EFTE-Motivs mit  $\text{Ca}^{2+}$  erklärt werden. Beim Wildtyp wird der Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Pore (über E595 und E598) aufgehalten, was zu einer kleineren Leitfähigkeit führt, weil dadurch die Permeation von  $\text{Na}^+$  elektrostatisch inhibiert wird. Bei TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q tritt dieser Effekt hingegen nicht auf.

In *Outside-Out*-Experimenten an der Mutante TRPC5-E595Q wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Einzelkanalamplitude dieser Mutante durch die Senkung des extrazellulären pH-Wertes im Gegensatz zum Wildtyp kaum reduziert wurde. Dies deutet auf eine Beteiligung von E595 an der Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit durch  $\text{H}^+$  hin. Im Gegensatz dazu wurde die Einzelkanalleitfähigkeit von TRPC5-E595Q durch  $\text{Li}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran (prozentual) ähnlich stark wie beim Wildtyp reduziert. Die Mechanismen, welche der Verminderung der Einzelkanalleitfähigkeit durch  $\text{Li}^+$  und  $\text{H}^+$  zugrund liegen, sind offenbar verschieden. Die Möglichkeit, dass  $\text{Li}^+$  durch stärkere Interaktion mit dem Selektivitätsfilter (580-GLLN-584, siehe oben) langsamer durch TRPC5 permeiert

als andere monovalente Kationen, z.B.  $\text{Na}^+$ , ist eher unwahrscheinlich. In diesem Fall müsste auch die Permeabilität von TRPC5 für  $\text{Li}^+$  größer sein als für  $\text{Na}^+$ . Es ist jedoch denkbar, dass der Eintritt in den Selektivitätsfilter durch die größere Solvathülle von  $\text{Li}^+$  erschwert ist und sein Flux durch TRPC5 auf diese Weise reduziert wird. Die Frage, welcher Mechanismus schließlich für die reduzierte Leitfähigkeit von TRPC5 mit  $\text{Li}^+$  auf der extrazellulären Seite der Membran verantwortlich ist, wird jedoch erst durch zukünftige Studien beantwortet werden können.



**Abbildung 4.6: Möglicher Mechanismus der größeren Einzelkanalleitfähigkeit der Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q.** Schematische Abbildung der Struktur von TRPC5 von TM5 bis TM6. Beim Wildtyp bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an die Glutamatreste E595 und E598 und inhibiert so den Ionenfluss von  $\text{Na}^+$  (*links*). Wird einer der beiden Glutamatreste durch Mutation neutralisiert, kann  $\text{Ca}^{2+}$  an dieser Stelle nicht mehr binden (*rechts*).  $\text{Na}^+$  hat dadurch besseren Zugang zum Selektivitätsfilter. Man beachte, dass E595 und E598 auch die Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5 beeinflussen (siehe Kap. 4.2). Trotz ihrer erhöhten Einzelkanalleitfähigkeit sind die Ganzzellströme durch die Mutanten TRPC5-E595Q und TRPC5-E598Q somit kleiner als beim Wildtyp.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ionenpermeation durch TRPC5 erstmals im Detail untersucht. Die Analyse von Punktmutanten gab Hinweise auf die beteiligten Aminosäuren und deren mögliche Positionen innerhalb der Pore des Kanals. Für ein genaueres Verständnis der Ionenpermeation durch TRPC5 sind jedoch in jedem Fall weitere Studien notwendig, die weitere Aminosäuren des Permeationsweges identifizieren und sich näher mit deren Ausrichtung in Bezug auf die Pore beschäftigen. Die Interaktion von Ionen mit dem Proteinrückgrat von TRPC5 ist wahrscheinlich ebenfalls ein Bestandteil der Permeationsprozesse durch den Kanal. Da solche Interaktionen experimentell sehr schwer zu untersuchen sind, wird letztendlich erst die Kenntnis der Röntgenstruktur einen Erklärungsansatz aller auftretenden Effekte der Ionenpermeation durch TRPC5 ermöglichen.



#### 4.4. Bedeutung der biophysikalischen Charakteristika von TRPC5

TRPC5 ist ein PLC-abhängig regulierter Kanal, der in der Lage ist, sowohl mono- als auch divalente Kationen über die Zellmembran zu transportieren. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Eigenschaften des Kanals geben Anlass, an dieser Stelle die mögliche Rolle von TRPC5 *in vivo* zu diskutieren. Unter physiologischen Bedingungen leitet TRPC5 vorwiegend Nettoströme in Einwärtsrichtung (Membranpotentiale zwischen ca. -70 mV und +30 mV). Größere Auswärtsströme durch diesen Kanal werden durch einen (zu großen Teilen)  $Mg^{2+}$ -abhängigen Block inhibiert, der bei Membranpotentialen zwischen -25 mV und +60 mV auftritt (Schaefer *et al.*, 2000, Obukhov & Nowycky, 2005). Weil TRPC5 weitestgehend unselektiv für Alkalimetall-Ionen ( $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) ist, sind demnach *in vivo* Einwärtsströme dieser Kationen durch TRPC5 möglich. Neben Membrandepolarisationen ist dieser Kanal folglich auch in der Lage,  $Ca^{2+}$ -Erhebungen im Cytosol hervorzurufen und somit intrazelluläre Signalwege zu aktivieren.

TRPC5-mRNA wurde hauptsächlich im Gehirn detektiert (Okada *et al.*, 1998, Philipp *et al.*, 1998), jedoch in geringeren Mengen auch in anderen Geweben, wie z. B. Herz, Leber oder Pankreas gefunden (Riccio *et al.*, 2002). In nativen Geweben sind Ströme durch homomere TRPC5-Kanäle oder heteromere Kanäle bestehend aus TRPC5, TRPC4 und/oder TRPC1 denkbar. Die Expression des letzteren Proteins ist ubiquitär und auch TRPC4 zeigt im Vergleich zu TRPC5 ein weitverbreitetes Expressionsmuster (Riccio *et al.*, 2002).

Es ist generell akzeptiert, dass TRPC5 ein Rezeptor-operierter Kanal ist, der intrazellulär über PLC-abhängige Signalwege aktiviert wird. Dies könnte entweder durch einen intrazellulären Botenstoff oder über die Entleerung der internen  $Ca^{2+}$ -Speicher geschehen. Der letztere Mechanismus wurde bei einigen TRPC5-Isoformen (Kaninchen: Philipp *et al.*, 1998, Mensch: Zeng *et al.*, 2004) beobachtet, bei anderen jedoch nicht (Maus: Schaefer *et al.*, 2000). Weitere Studien belegten, dass die Aktivität durch extrazelluläre Gabe von  $Gd^{3+}$  und  $Ca^{2+}$  reguliert wird, wobei die physiologische Signifikanz hierbei fraglich ist (Zeng *et al.*, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass TRPC5 auch durch Lysophospholipide (Flemming *et al.*, 2006) und durch Cystein-S-Nitrosylierung (Yoshida *et al.*, 2006) aktiviert werden kann. Diese Mechanismen könnten durchaus eine physiologische Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivität von TRPC5 durch extrazelluläre  $H^+$  moduliert wird. Die Ströme stiegen konzentrationsabhängig von pH 8,0 auf Maximalwerte bei ca. pH 6,5 bis pH 6,0. Weitere Senkungen des pH-Wertes reduzierten die maximalen Ströme durch TRPC5 (pH 5,5), und bei pH 4,2 wurde der Kanal fast vollständig inhibiert. Die meisten Kationen-permeablen Kanäle, z.B. spannungsabhängige  $Na^+$ -,  $K^+$ -,  $Ca^{2+}$ - Kanäle, Glutamatrezeptoren oder CNG-Kanäle, werden durch extrazelluläre  $H^+$  ausschließlich blockiert (Traynelis & Cull-Candy, 1991). Als Ausnahmen sind, neben TRPV1 (Caterina *et*

*al.*, 1997, Tominaga *et al.*, 1998, Jordt *et al.*, 2000), TRPM7 (Li *et al.*, 2007) und TRPC4 (siehe Kap. 3.3.5), P2X-Rezeptoren aus nodösen Ganglien der Ratte (Li *et al.*, 1996) und die Mitglieder der ASIC-Familie bekannt. Letztere werden durch die pH-abhängige Aufhebung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocks reguliert (Immke & McCleskey, 2003). ASIC1a wird endogen in HEK293-Zellen exprimiert (Gunthorpe *et al.*, 2001), und Ströme durch diesen Kanal wurden auch in der vorliegenden Arbeit bei Reduktionen des extrazellulären pH-Wertes auf pH 6,5 (oder niedriger) beobachtet. Abhängig von der Kanalvariante unterscheiden sich ASIC-Homomere in ihrer Sensitivität für  $\text{H}^+$ . ASIC3 zeigt dabei die höchste Sensitivität und wird bereits bei Änderungen des pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 7,1 aktiviert (Hesselager *et al.*, 2004). TRPC5 (Maus-Variante, siehe Kap. 3.3.2) wird ebenfalls schon bei kleinen Reduktionen des pH-Wertes stimuliert. Die basale Aktivität des Kanals wird bei geringen pH-Steigerungen (pH 8,0) ausgehend von pH 7,4 reduziert und erhöht sich bei kleinen pH-Senkungen (pH 7,0). In dieser Hinsicht ist TRPC5 weitaus sensibler als TRPV1, bei dem kleinere Basalaktivitäten und pH-abhängige Aktivierungen erst ab pH 6,5 berichtet wurden (Tominaga *et al.*, 1998). Zusammenfassend wird deutlich, dass die Potenzierung von TRPC5 durch  $\text{H}^+$  an sich schon eine Besonderheit unter Kationen-permeablen Kanälen ist. Zusätzlich zeigen Ströme durch TRPC5 eine sehr hohe Sensitivität zum extrazellulären pH-Wert, höher als bei den meisten bekannten,  $\text{H}^+$ -regulierten Kanälen zu beobachten ist. Dies deutet darauf hin, dass TRPC5 *in vivo* als ein pH-Sensor fungieren könnte, der Änderungen des extrazellulären pH-Werts mit Aktivierung von Ionenkanälen, Membrandepolarisation und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verbindet. Die letzteren beiden Effekte würden durch TRPC5 selbst und, falls präsent, durch spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle hervorgerufen werden, welche durch Depolarisation geöffnet werden. Im Widerspruch zu diesen Überlegungen und den Daten der vorliegenden Arbeit wurden in glatten Muskelzellen des Darms vom Meerschweinchen Rezeptor-operierte Ströme beobachtet, die durch Ansäuern des extrazellulären Milieus inhibiert, und bei basischen pH-Werten potenziert wurden (Zholos & Bolton, 1997). In einer kürzlich erschienenen Studie wurde gezeigt, dass die Rezeptor-operierten Ströme in diesen Zellen hauptsächlich auf TRPC4, und zu geringen Teilen auf TRPC6 zurückzuführen sind (Tsvilovsky *et al.*, 2009). Warum die nativen Ströme durch TRPC4 jedoch durch Änderungen des extrazellulären pH-Werts anders moduliert werden als heterolog exprimierte, bleibt weitestgehend unklar.

Ein weiteres Ergebnis dieser Doktorarbeit ist die Potenzierung der TRPC5-Aktivität durch den Austausch des extrazellulären  $\text{Na}^+$  durch ein anderes Alkalimetall-Ion ( $\text{X}^+$ , siehe Kap. 3.4.4.1). Obwohl die Konzentrationsabhängigkeit hier nicht untersucht wurde, könnte auch dieser Mechanismus physiologisch relevant sein. Wie bei der Potenzierung durch extrazelluläre  $\text{H}^+$  sind nur wenige Ionenkanäle bekannt, die durch monovalente Kationen (Alkalimetall-Ionen) stimuliert werden

können. Von einwärts rektifizierenden  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ir}$ ) ist z.B. bekannt, dass sie durch extrazelluläres  $K^+$  stimuliert werden (Knot *et al.*, 1996). Auch bei TRPV1 sind die stimulierenden Effekte sowohl mono- als auch divalenter Kationen bekannt (Ahern *et al.*, 2005). Die in Kapitel 3.4.5 dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen hingegen für TRPC3 bzw. TRPC6 eine leichte Abschwächung der Ströme beim Austausch von  $Na^+$  gegen  $X^+$ . Es ist wahrscheinlich, dass der Mechanismus von TRPC5 zur Potenzierung seiner Ströme durch Alkalimetall-Ionen eine Besonderheit darstellt, die nur bei wenigen anderen Kationen-permeablen Kanälen vorkommt. Möglicherweise wird TRPC5 auch in nativen Geweben durch die ionische Zusammensetzung ( $Na^+$ ,  $X^+$ ) der extrazellulären Lösung moduliert. Zusammen mit der Abhängigkeit seiner Ströme vom extrazellulären pH-Wert (siehe Kap. 3.3.2) und möglicherweise auch der  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Jung *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2004) ist TRPC5 somit in der Lage, Änderungen der extrazellulären Ionenzusammensetzung in intrazelluläre Signale zu übersetzen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde an einem TRPC5-*Knock-Out*-Modell (TRPC5<sup>-/-</sup>) gezeigt, dass Rezeptor-abhängige Ströme (mGluR I und CCK2) in Neuronen aus der Amygdala signifikant reduziert sind (Ricchio *et al.*, 2009). Aus den Ergebnissen von Verhaltensexperimenten und Studien zur synaptischen Konnektivität schließen die Autoren außerdem auf eine Rolle von TRPC5 im angeborenen Angstverhalten von Mäusen. Auch in zukünftigen Studien werden vermehrt *Knock-Out*-Modelle zum Einsatz kommen, um weitere physiologische Funktionen von TRPC5 aufzuklären. Die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals sind dabei eine Grundvoraussetzung für seine Identifikation in nativen Geweben. Es wird interessant sein zu sehen, welche Areale im Gehirn und anderen Geweben TRPC5 funktionell exprimieren und welche Rolle dem Kanal in Bezug auf die extrazelluläre Ionenzusammensetzung zukommt.

## 5. Zusammenfassung

Klassische TRP-Kanäle (TRPC) sind  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable, unselektive Kationenkanäle, die durch PLC-abhängige Signalwege intrazellulär aktiviert werden. Obwohl die ersten Mitglieder dieser Subfamilie bereits vor über 15 Jahren kloniert wurden, sind sie auf funktioneller Ebene bisher nur unvollständig untersucht. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die biophysikalischen Eigenschaften von TRPC5 im heterologen Expressionssystem mit Hilfe von molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden im Detail zu studieren und mit denen anderer Vertreter der TRPC-Subfamilie zu vergleichen.

1. HEK293-Zellen, die die cDNA von TRPC5 transient überexprimieren, wurden in Patch-Clamp-Experimenten im Ganzzell-Modus untersucht. Die Stimulation PLC-vermittelter Signalwege führte zu transienten Einwärtsströmen bei einem Haltepotential von -60 mV. Die I-V-Beziehungen dieser Ströme waren charakteristisch für TRPC5 mit einem doppelt-rectifizierenden Verlauf und einem Umkehrpotential nahe 0 mV. Infolge von hyperpolarisierenden Spannungssprüngen kam es zu einem Abfall der Ströme, welcher durch ein spannungsabhängiges Schließen der Kanäle zurückzuführen war (Tailströme). Die Spannungsabhängigkeit von TRPC5 stellte sich in Folgeexperimenten jedoch als sehr schwach heraus. Mithilfe eines einfachen *Two-State-Models* konnte lediglich abgeschätzt werden, dass die *gating charge* von TRPC5 maximal 0,3 Valenzen beträgt und es während der PLC-vermittelten Aktivierung des Kanals zu einer Verschiebung seiner g-V-Beziehung in Richtung negativer Potentiale kommt. TRPC4 zeigte ähnliche Tailströme wie TRPC5, und eine Kopplung seiner PLC-vermittelten Aktivierung mit der Verschiebung seiner Spannungsabhängigkeit ist sehr wahrscheinlich. Bei TRPC3 und TRPC6 hingegen wiesen die Tailströme eine deutlich schnellere Kinetik auf, und die g-V-Beziehungen verschoben sich mit steigender PLC-Aktivität eher in Richtung höherer Leitfähigkeiten. Die Experimente zur Spannungsabhängigkeit zeigen, dass die Ströme durch alle untersuchten TRPC-Isoformen eine Spannungsabhängigkeit aufweisen. In ihrer Kinetik und ihrer PLC-Abhängigkeit unterscheiden sich jedoch insbesondere die Effekte zwischen den Mitgliedern der Gruppe 3 (TRPC3/6) von denen der Gruppe 4 (TRPC4/5).
2. Im Überexpressionssystem (HEK293) wurde untersucht, ob die Ströme durch TRPC5 durch Änderungen des extrazellulären pH-Werts moduliert werden können. Es zeigte sich, dass die PLC-vermittelten Ströme durch den Kanal bei Reduktionen des extrazellulären pH-Werts (pH 7,0, pH 6,5, pH 6,0) konzentrationsabhängig potenziert werden und dass es bei einer extra-

zellulären Alkalose (pH 8,0) zur Verminderung der Ströme kommt. Eine starke Azidifizierung des extrazellulären Milieus führte zu einer Abschwächung der Potenzierung (pH 5,5) bzw. zur fast vollständigen Inhibition der Ströme durch TRPC5 (pH 4,2). Auch basal aktive TRPC5-Kanäle konnten durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts in ähnlicher Weise stimuliert werden wie die PLC-abhängig aktivierten. Auf Einzelkanalebene änderten sich die Charakteristika der TRPC5-Ströme beim Wechsel von pH 7,4 auf pH 6,5 drastisch, mit einer deutlichen Reduktion der Leitfähigkeit und einer signifikanten Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit. In einem Ansatz zur Identifikation der molekularen Determinanten der pH-abhängigen Potenzierung von TRPC5 wurden zwei Glutamatreste (E543 und E595) näher untersucht. Diese flankieren Porenregion von TRPC5 und sind an der Potenzierung des Kanals durch extrazelluläre Lanthanoide beteiligt. Die PLC-abhängigen Ströme durch die Punktmutante TRPC5-E543Q waren gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht und wurden durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts konzentrationsabhängig inhibiert ( $pI_{C_{50}} = 4,5$ ). Die basalen Ströme durch diese Mutante verhielten sich jedoch ähnlich wie beim Wildtyp. TRPC5-E595Q zeigte hingegen deutlich kleinere Ströme als der Wildtyp. Im Gegensatz zu TRPC5-E543Q war die Potenzierung der basalen Ströme verschwindend gering, die der PLC-abhängig aktivierten Ströme ähnelte jedoch dem Wildtyp. Der Mechanismus der Potenzierung von TRPC5 durch extrazelluläre  $H^+$  ähnelt somit auf molekularer Ebene dem von TRPV1, wo die Mutation von Glutamatresten an analogen Positionen ähnliche Effekte wie bei TRPC5 hervorruft. TRPC4, das ebenfalls Glutamatreste an den untersuchten Schlüsselpositionen besitzt, konnte wie TRPC5 durch Reduktionen des extrazellulären pH-Werts potenziert werden. Im Gegensatz dazu kam es bei TRPC6 zu einer  $H^+$ -abhängigen Inhibition der Ströme mit einem  $pI_{C_{50}}$  von 5,7.

3. Zur Untersuchung der Ionenpermeation durch TRPC5 wurden im Überexpressionssystem die relativen Permeabilitäten bestimmt. Die Permeabilitäten für Alkalimetall-Ionen folgten der Eisenmann-Reihe IV, während die  $P_{30Ca} / P_{150Na^-}$  bzw.  $P_{30Mg} / P_{150Na}$  Werte mit 3,8 und 1,8 auf eine schwache Selektivität von TRPC5 für divalente Kationen hinwiesen. TRPC4 (Eisenmann IV), TRPC3 und TRPC6 (jeweils Eisenmann III) hatten ähnliche relative Permeabilitäten für monovalente Kationen wie TRPC5. Um die Lage des Selektivitätsfilters von TRPC5 zu lokalisieren, wurden Punktmutanten generiert. Zwei von ihnen, TRPC5-E559Q und -N584D, hatten vom Wildtyp verschiedene I-V-Beziehungen, und zeigten veränderte Permeabilitätswerte für divalente Kationen. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit bakteriellen Kationenkanälen deutet vieles auf eine Beteiligung von N584 am

Selektivitätsfilter von TRPC5 hin, während E559 an einer Bindungsstelle für divalente Kationen im äußeren Vestibül beteiligt sein könnte. Ein weiteres Ergebnis der Experimente zur Ionenpermeation durch TRPC5 bestand in dem Befund, dass extrazelluläre Alkalimetall-Ionen die Ströme durch den Kanal potenzieren. Die Eigenschaften dieses Effekts, d.h. die Änderung der Einzelkanalcharakteristika und die beteiligten Aminosäuren, waren der Potenzierung von TRPC5 durch extrazelluläre H<sup>+</sup> sehr ähnlich.

Zusammenfassend wurde TRPC5 in dieser Arbeit als ein spannungsabhängig gesteuerter Kationenkanal herausgestellt, dessen Aktivität durch ein breites Spektrum an extrazellulären, positiv geladenen Elementarionen direkt moduliert werden kann. Die Permeation von mono- und divalenten Kationen durch TRPC5 ist unselektiv und wird durch Aminosäuren im Bereich zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne determiniert.

## 6. Summary

Classical TRP channels (TRPC) are  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable, unselective cation channels that are activated by PLC-dependent intracellular pathways. Although most members of this subfamily were cloned at least 10 years ago, functional data on some of their biophysical properties are still not available. The main aim of this study was to investigate the properties of TRPC5, and to compare them with those of other members of the TRPC subfamily.

1. HEK293 cells were transiently transfected with the cDNA of TRPC5, and studied in patch clamp experiments in the whole-cell configuration. The stimulation of PLC-dependent pathways led to transient inward currents in these cells at -60 mV. The current-voltage relationships were characteristic for TRPC5 with a doubly-rectifying shape and a reversal potential close to 0 mV. Upon application of hyperpolarizing voltage pulses, TRPC5 currents decreased in a time-dependent manner, due to voltage-dependent closure of the channels. In a series of subsequent experiments, TRPC5 was shown to display weak voltage dependence. According to a simple two-state model, the gating charge was estimated to be at most 0.3 e, and PLC-dependent changes in  $V_{1/2}$  led to a shift of the g-V relationship towards more negative membrane potentials. The tail currents of TRPC4 were largely similar to those of TRPC5, indicating a similar coupling of PLC- and voltage-dependent mechanisms. In contrast, the tail currents of TRPC3 and TRPC6 had faster kinetics, and with increasing PLC activity, their g-V relationships shifted towards higher conductances. The experiments of this part demonstrate that monomeric ion channels formed by TRPC3-6 are all voltage-dependent. However, in terms of their PLC-dependence and their kinetics, voltage-dependent characteristics of group 3 TRPC channels (TRPC3,6) differ from those of group 4 TRPC channels (TRPC4,5).
2. Reductions in extracellular pH from pH 7.4 to pH 7.0, 6.5 and 6.0 led to a concentration-dependent potentiation of PLC-mediated TRPC5 currents, whereas an increase in pH (pH 8.0) led to decreased currents. With strong acidification of the external milieu, current potentiation was weaker (pH 5.5) or currents were blocked almost completely (pH 4.2). Like PLC-mediated currents, basal currents were also modulated by extracellular  $\text{H}^+$ . The single channel characteristics of TRPC5 changed drastically in response to extracellular pH reductions, with large decreases in single channel conductance, and significant increases in open probability. In an attempt to identify the molecular determinants of the pH-dependent potentiation of TRPC5, two glutamate residues were studied in more detail (E543 and E595). These acidic amino acids flank the putative pore region, and are

known to be determinants of the potentiation of TRPC5 by extracellular lanthanoids. The PLC-mediated currents through TRPC5-E543Q were significantly larger than those of the wildtype, and only inhibited by reductions in extracellular pH in a concentration-dependent manner ( $pI_{C_{50}} = 4.5$ ). However, the basally active currents through this mutant were potentiated by extracellular  $H^+$ . TRPC5-E595Q produced much smaller currents than the wildtype under similar conditions. In contrast to TRPC5-E543Q, the potentiation of the basal currents was marginal, whereas the potentiation of the PLC-mediated currents through TRPC5-E595Q resembled that of the wildtype. In summary, the molecular mechanism of TRPC5 potentiation by extracellular  $H^+$  is very similar to TRPV1 where the mutation of glutamate residues at analog positions has similar effects. TRPC4 that also possesses glutamate residues at the key positions was also potentiated by reductions in extracellular pH. In contrast, TRPC6 was only inhibited by  $H^+$  with a  $pI_{C_{50}}$  of 5.7.

3. To study the ion permeation through TRPC5, the relative permeabilities for mono- and divalent cations were determined. The values for the alkali metal ions followed Eisenmann series IV, indicating a relatively weak electric field around the selectivity filter of TRPC5. The  $P_{30Ca} / P_{150Na}$  and  $P_{30Mg} / P_{150Na}$  values of 3.8 and 1.8 indicated a weak selectivity of TRPC5 for divalent cations. TRPC4 (Eisenmann IV), TRPC3 and TRPC6 (Eisenmann III) displayed similar permeability values for monovalent cations. To localise the position of the TRPC5 selectivity filter, point mutants were generated. Two of them – TRPC5-E559Q and -N584D – showed different I-V relationships and an altered permeation of divalent cations compared to the wildtype channel. Sequence alignments with bacterial cation channels point to the region around N584 as the possible selectivity filter of TRPC5, although an involvement of E559 can not completely be excluded. A further result of the permeation experiments was the demonstration of strong potentiatory effects of extracellular alkali metal ions on currents through TRPC5. The properties of this potentiation, in terms of the change of the single channel characteristics and the amino acids responsible, were largely similar to the potentiation of TRPC5 by extracellular  $H^+$  and lanthanoids.

In the present study, TRPC5 was characterised to be a voltage-dependent channel that can be modulated directly by a multiplicity of extracellular elementary cations. The permeation of mono- or divalent cations through TRPC5 is unselective and determined by amino acids between the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> transmembrane domain.



## 7. Literatur

- Aggarwal, S. K., and MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **16**, 1169-1177
- Ahern, G. P., Brooks, I. M., Miyares, R. L., and Wang, X. B. (2005). Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci* **25**, 5109-5116
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201
- Babes, A., Zorzon, D., and Reid, G. (2004). Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci* **20**, 2276-2282
- Beech, D. J. (2005). TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch* **451**, 53-60
- Beech, D. J. (2007). Canonical transient receptor potential 5. *Handb Exp Pharmacol*, 109-123
- Beech, D. J., Muraki, K., and Flemming, R. (2004). Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J Physiol* **559**, 685-706
- Begenisich, T. B., and Cahalan, M. D. (1980). Sodium channel permeation in squid axons: Reversal potential experiments. *J Physiol* **307**, 217-242
- Benham, C. D., Hess, P., and Tsien, R. W. (1987). Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ Res* **61**, 110-16.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242
- Bernstein, H. J. (2000). Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem Sci* **25**, 453-455
- Bezzierides, V. J., Ramsey, I. S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D. E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* **6**, 702-720
- Blaustein, M. P., and Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **79**, 763-854.
- Bodding, M. (2007). TRPM6: A Janus-like protein. *Handb Exp Pharmacol*, 299-311
- Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., and Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1051-1061

- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X. J., Kamme, F., Meurers, B., Bakker, M., Jurzak, M., Leysen, J. E., and Erlander, M. G. (2002). Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res* **943**, 38-47
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homologue of *Drosophila* transient receptor potential (TRP) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G<sub>q</sub> class of G protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 29672-29680
- Brauchi, S., Orio, P., and Latorre, R. (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15494-15499
- Caterina, M., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824
- Cavalié, A. (2007). Ionic channels formed by TRPC4. *Handb Exp Pharmacol*, 93-108
- Chang, A. S., Chang, S. M., Garcia, R. L., and Schilling, W. P. (1997). Concomitant and hormonally regulated expression of *trp* genes in bovine aortic endothelial cells. *FEBS Letters* **415**, 335-340
- Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S. A., Stokes, A. J., Kinet, J. P., Fleig, A., and Penner, R. (2007). TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* **41**, 51-61
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396.
- Corey, D. P., Garcia-Anoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M.A., Amalfitano, A., Cheung, E. L., Derfler, B. H., Duggan, A., Geleoc, G. S., Gray, P. A., Hoffman, M. P., Rehm, H. L., Tamasauskas, D., and Zhang, D.S. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-730
- Cosens, D. J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-287.
- Dietrich, A., Kalwa, H., Fuchs, B., Grimminger, F., Weissmann, N., and Gudermann, T. (2007). In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* **42**, 233-244
- Dietrich, A., Mederos, Y. S. M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F. C., Gudermann, T., and Birnbaumer, L. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol* **25**, 6980-6989

- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S.L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
- Dresviannikov, A. V., Bolton, T. B., and Zholos, A. V. (2006). Muscarinic receptor-activated cationic channels in murine ileal myocytes. *Br J Pharmacol* **149**, 179-187
- Ebashi, S. (1972). Calcium ions and muscle contraction. *Nature* **240**, 217-218.
- Edwards, C. (1982). The selectivity of ion channels in nerve and muscle. *Neuroscience* **7**, 1335-1366
- Eickhorst, A. N., Berson, A., Cockayne, D., Lester, H. A., and Khakh, B. S. (2002). Control of P2X<sub>2</sub> channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* **120**, 119-131
- Eisenman, G. (1962). Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys J* **2**, 259-323
- Eisenman, G., and Horn, R. (1983). Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J Membr Biol* **76**, 197-225
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., and Tsien, R. W. (1995). Ca<sup>2+</sup> channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca<sup>2+</sup> interactions. *Neuron* **15**, 1121-1132
- Elliott, A. C. (2001). Recent developments in non-excitabile cell calcium entry. *Cell Calcium* **30**, 73-93.
- Fasolato, C., Innocenti, B., and Pozzan, T. (1994). Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx: How many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 77-83
- Fenwick, E. M., Marty, A., and Neher, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **331**, 599-635.
- Flemming, P. K., Dedman, A. M., Xu, S. Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C. D., Bateson, A. N., Muraki, K., and Beech, D. J. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J Biol Chem* **281**, 4977-4982
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol* **3**, 121-127.
- Funayama, M., Goto, K., and Kondo, H. (1996). Cloning and expression localization of cDNA for rat homolog of TRP protein, a possible store-operated calcium (Ca<sup>2+</sup>) channel. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 259-266.
- Garcia, R. L., and Schilling, W. P. (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **239**, 279-283

- Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J. M., and Ferrer-Montiel, A. (2000). Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* **275**, 32552-32558
- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D. E. (2003). TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* **6**, 837-845
- Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X., and Schreibmayer, W. (1998). Trp proteins form store-operated channels in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* **437**, 101-106
- Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., and Davis, J. B. (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 183-191.
- Gunthorpe, M. J., Harries, M. H., Prinjha, R. K., Davis, J. B., and Randall, A. (2000). Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* **525 Pt 3**, 747-759
- Gunthorpe, M. J., Smith, G. D., Davis, J. B., and Randall, A. D. (2001). Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch* **442**, 668-674
- Halaszovich, C. R., Zitt, C., Jungling, E., and Luckhoff, A. (2000). Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* **275**, 37423-37428.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- Hardie, R. C., and Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* **8**, 643-651
- Hess, P., Lansman, J. B., and Tsien, R. W. (1986). Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol* **88**, 293-319
- Hesselager, M., Timmermann, D. B., and Ahring, P. K. (2004). pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* **279**, 11006-11015
- Hoenderop, J. G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R. J., and Nilius, B. (2001). Function and expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* **537**, 747-761.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol *Nature* **397**, 259-263

- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7461-7466.
- Immke, D. C., and McCleskey, E. W. (2003). Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of  $\text{Ca}^{2+}$  blockade. *Neuron* **37**, 75-84
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha_1$  - adrenoceptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ Res* **88**, 325-332.
- Jiang, J., Li, M., and Yue, L. (2005). Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol* **126**, 137-150
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel. *Nature* **423**, 33-41
- Jordt, S. E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8134-8139.
- Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T. D. (2003). Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* **278**, 3562-3571
- Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T. D. (2002). TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C347-359.
- Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* **518**, 345-358
- Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* **1**, 165-170
- Kielland, J. (1937). Individual Activity Coefficients of Ions in Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society* **59**, 1675-1678
- Kiselyov, K., and Muallem, S. (1999). Fatty acids, diacylglycerol,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Trends Neurosci.* **22**, 334-337
- Knot, H. J., Zimmermann, P. A., and Nelson, M. T. (1996). Extracellular  $\text{K}^+$ -induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier  $\text{K}^+$  channels. *J Physiol* **492 ( Pt 2)**, 419-430
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D. S., Woolf, C. J., and Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277-289

- Lee, S. Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15441-15446
- Lettvin, J. Y., Pickard, W. F., McCulloch, W. S., and Pitts, W. (1964). A Theory of Passive Ion Flux through Axon Membranes. *Nature* **202**, 1338-1339
- Lewis, C. A. (1979). Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* **286**, 417-445
- Li, C., Peoples, R. W., and Weight, F. F. (1996). Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn<sup>2+</sup> in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* **76**, 3048-3058
- Li, H. S., Xu, X. Z., and Montell, C. (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* **24**, 261-273.
- Li, M., Du, J., Jiang, J., Ratzan, W., Su, L. T., Runnels, L. W., and Yue, L. (2007). Molecular determinants of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7 *J Biol Chem* **282**, 25817-25830
- Li, Y., Jia, Y. C., Cui, K., Li, N., Zheng, Z. Y., Wang, Y. Z., and Yuan, X. B. (2005). Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived Neurotrophic factor. *Nature* **434**, 894-898
- Liman, E. R., Corey, D. P., and Dulac, C. (1999). TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5791-5796
- Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W. F., Romanin, C., Zhu, M. X., and Groschner, K. (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive cation channels. *J Biol Chem* **275**, 27799-27805.
- Liu, C. H., Wang, T., Postma, M., Obukhov, A. G., Montell, C., and Hardie, R. C. (2007). In vivo identification and manipulation of the Ca<sup>2+</sup> selectivity filter in the Drosophila transient receptor potential channel. *J Neurosci* **27**, 604-615
- Liu, D., Zhang, Z., and Liman, E. R. (2005). Extracellular acid block and acid-enhanced inactivation of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM5 involve residues in the S3-S4 and S5-S6 extracellular domains. *J Biol Chem* **280**, 20691-20699
- Liu, X., Singh, B. B., and Ambudkar, I. S. (2003). TRPC1 is required for functional store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem* **278**, 11337-11343
- Llinas, R. R. (1982). Calcium in synaptic transmission. *Sci Am* **247**, 56-65.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* **40**, 551-561

- Matta, J. A., and Ahern, G. P. (2007). Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* **585**, 469-482
- Mayer, C. J., van Breemen, C., and Casteels, T. (1972). The action of lanthanum and D600 on the calcium exchange in the smooth muscle cells of the guinea-pig *Taenia coli*. *Pflugers Arch* **337**, 333-350
- Mederos y Schnitzler, M., Waring, J., Gudermann, T., and Chubanov, V. (2008). Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *Faseb J* **22**, 1540-1551
- Minke, B., and Selinger, Z. (1996). The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 459-466
- Minke, B., Wu, C., and Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* **258**, 84-87.
- Misquitta, C. M., Mack, D. P., and Grover, A. K. (1999). Sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* **25**, 277-290.
- Mizuno, M., Kitayama, S., Saishin, Y., Shimada, S., Morita, K., Mitsuhashi, C., Kurihara, H., and Dohi, T. (1999). Molecular cloning and characterization of rat *trp* homologues from brain. *Mol. Brain Res.* **64**, 41-51
- Montell, C. (2005). TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* **567**, 45-51
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A. M., Schultz, G., Shimizu, N., and Zhu, M. X. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**, 229-231.
- Munsch, T., Freichel, M., Flockerzi, V., and Pape, H. C. (2003). Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 16065-16070
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., and Flockerzi, V. (2003). Voltage dependence of the  $Ca^{2+}$ -activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **278**, 30813-30820
- Nilius, B., Prenen, J., Janssens, A., Owsianik, G., Wang, C., Zhu, M. X., and Voets, T. (2005a). The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **280**, 22899-22906
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., and Voets, T. (2005b). Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* **567**, 35-44

- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J. G., Droogmans, G., and Bindels, R. J. (2001). The single pore residue Asp542 determines  $\text{Ca}^{2+}$  permeation and  $\text{Mg}^{2+}$  block of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *J Biol Chem* **276**, 1020-1025.
- Nilius, B., and Voets, T. (2005). TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* **451**, 1-10
- Numaga, T., Wakamori, M., and Mori, Y. (2007). Trpc7. *Handb Exp Pharmacol*, 143-151
- Obukhov, A. G., and Nowycky, M. C. (2005). A cytosolic residue mediates  $\text{Mg}^{2+}$  block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel. *J Neurosci* **25**, 1234-1239
- Obukhov, A. G., and Nowycky, M. C. (2008). TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle. *J Cell Physiol* **216**, 162-171
- Odell, A. F., Scott, J. L., and Van Helden, D. F. (2005). Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* **280**, 37974-37987
- Ohta, T., Imagawa, T., and Ito, S. (2008). Novel gating and sensitizing mechanism of capsaicin receptor (TRPV1): tonic inhibitory regulation of extracellular sodium through the external protonation sites on TRPV1. *J Biol Chem* **283**, 9377-9387
- Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., and Mori, Y. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7.  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **274**, 27359-27370.
- Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., and Mori, Y. (1998). Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP  $\text{Ca}^{2+}$  channel from mouse brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 10279-10287
- Opsahl, L. R., and Webb, W. W. (1994). Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys J* **66**, 75-79
- Otsuka, Y., Sakagami, H., Owada, Y., and Kondo, H. (1998). Differential localization of mRNAs for mammalian trps, presumptive capacitative calcium entry channels, in the adult mouse brain. *Tohoku J Exp Med* **185**, 139-146.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., and Nilius, B. (2005). Permeation and Selectivity of TRP Channels. *Annu Rev Physiol*



- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529-539
- Penner, R., and Fleig, A. (2007). The  $Mg^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ -nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol*, 313-328
- Penniston, J. T., and Enyedi, A. (1998). Modulation of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump. *J Membr Biol* **165**, 101-109.
- Petersen, O. H., Tepikin, A., and Park, M. K. (2001). The endoplasmic reticulum: one continuous or several separate  $Ca^{2+}$  stores? *Trends Neurosci* **24**, 271-276.
- Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., and Flockerzi, V. (1996a). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *Embo J* **15**, 6166-6171
- Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (1998a). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *Embo J* **17**, 4274-4282
- Pingle, S. C., Matta, J. A., and Ahern, G. P. (2007). Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol*, 155-171
- Plant, T. D., and Schaefer, M. (2005). Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 266-276
- Putney, J. W., Jr. (2004). The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* **14**, 282-286
- Putney, J. W., Jr., and Bird, G. S. (1993). The inositol phosphate-calcium signalling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev* **14**, 610-631
- Ramanan, S. V., Fan, S. F., and Brink, P. R. (1992). Model invariant method for extracting single-channel mean open and closed times from heterogeneous multichannel records. *J Neurosci Methods* **42**, 91-103.
- Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P. L., Clapham, D. E., and Pollak, M. R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* **37**, 739-744
- Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K. S., Smith, K. S., Rudolph, U., Gapon, S., Yao, G. L., Tsvetkov, E., Rodig, S. J., Van't Veer, A., Meloni, E. G., Carlezon, W. A., Jr., Bolshakov, V. Y., and Clapham, D. E. (2009). Essential role for TRPC5 in amygdale function and fear-related behavior. *Cell* **137**, 761-772

- Riccio, A., Mattei, C., Kelsell, R. E., Medhurst, A. D., Calver, A. R., Randall, A. D., Davis, J. B., Benham, C. D., and Pangalos, M. N. (2002a). Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J Biol Chem* **277**, 12302-12309.
- Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., and Pangalos, M. N. (2002b). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 95-104
- Rychkov, G., and Barritt, G. J. (2007). TRPC1  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels in animal cells. *Handb Exp Pharmacol*, 23-52
- Sakmann, B., and Neher, E. (eds) (1983) *Single-Channel Recording*, first edition Ed., Plenum Press, New York
- Sather, W. A., and McCleskey, E. W. (2003). Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* **65**, 133-159
- Sayle, R. A., and Milner-White, E. J. (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* **20**, 374
- Schaefer, M., Albrecht, N., Hofmann, T., Gudermann, T., and Schultz, G. (2001). Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isoforms. *Faseb J* **15**, 1634-1636
- Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., and Schultz, G. (2000). Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* **275**, 17517-17526.
- Schaefer, M., Plant, T. D., Stresow, N., Albrecht, N., and Schultz, G. (2002). Functional differences between TRPC4 splice variants. *J Biol Chem* **277**, 3752-3759.
- Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., and Jiang, Y. (2006). Atomic structure of a  $\text{Na}^{+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -conducting channel. *Nature* **440**, 570-574
- Shim, S., Goh, E. L., Ge, S., Sailor, K., Yuan, J. P., Roderick, H. L., Bootman, M. D., Worley, P. F., Song, H., and Ming, G. L. (2005). XTRPC1-dependent chemotropic guidance of neuronal growth cones. *Nat Neurosci* **8**, 730-735
- Singh, B. B., Lockwich, T. P., Bandyopadhyay, B. C., Liu, X., Bollimuntha, S., Brazer, S. C., Combs, C., Das, S., Leenders, A. G., Sheng, Z. H., Knepper, M. A., Ambudkar, S. V., and Ambudkar, I. S. (2004). VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Mol Cell* **15**, 635-646
- Sinkins, W. G., Estacion, M., and Schilling, W. P. (1998). Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J* **331**, 331-339.
- Smith, R. M., and Martell, A. E. (1975) *Critical Stability Constants: Amines*, 002, Plenum Press

- Striggow, F., and Ehrlich, B. E. (1996). Ligand-gated calcium channels inside and out. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 490-495.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., and Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695-702.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-655.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* **278**, 39014-39019
- Strunecka, A., Strunecky, O., and Patocka, J. (2002). Fluoride plus aluminum: useful tools in laboratory investigations, but messengers of false information. *Physiol Res* **51**, 557-564
- Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., Wang, Y., Cullen, K., Lambert, S., and Florman, H.M. (2004). Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol* **274**, 426-435
- Sylvester, J. B., Mwanjewe, J., and Grover, A. K. (2001). Transient receptor potential protein mRNA expression in rat substantia nigra. *Neurosci Lett* **300**, 83-86.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F., and Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* **438**, 1022-1025
- Tominaga, M., Caterina, M., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-543
- Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., and Vlachova, V. (2005). Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci* **30**, 207-217
- Traynelis, S. F., and Cull-Candy, S. G. (1991). Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones. *J Physiol* **433**, 727-763
- Tsvilovskyy, V. V., Zholos, A. V., Aberle, T., Philipp, S. E., Dietrich, A., Zhu, M. X., Birnbaumer, L., Freichel, M., and Flockerzi, V. (2009). Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* **137**, 1415-1424
- van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S., and Schlegel, W. (1999). Calcium signalling and gene expression. *J Recept Signal Transduct Res* **19**, 481-492.

- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1999). Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2060-2064
- Venkatachalam, K., Ma, H. T., Ford, D. L., and Gill, D. L. (2001). Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells. *J Biol Chem* **276**, 33980-33985.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-754
- Voets, T., and Nilius, B. (2003). The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium* **33**, 299-302
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K., and Nilius, B. (2007a). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* **3**, 174-182
- Voets, T., Owsianik, G., and Nilius, B. (2007b). *Trpm8*. *Handb Exp Pharmacol*, 329-344
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Boddling, M., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* **277**, 33704-33710
- Voets, T., Talavera, K., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* **1**, 85-92
- Walker, R. L., Hume, J. R., and Horowitz, B. (2001). Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1184-1192.
- Wang, G. X., and Poo, M. M. (2005). Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* **434**, 898-904
- Warnat, J., Philipp, S., Zimmer, S., Flockerzi, V., and Cavalie, A. (1999). Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Physiol* **518 ( Pt 3)**, 631-638
- Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C.D., and Nilius, B. (2002). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* **277**, 13569-13577.
- Wells, G. B., and Tanaka, J. C. (1997). Ion selectivity predictions from a two-site permeation model for the cyclic nucleotide-gated channel of retinal rod cells. *Biophys J* **72**, 127-140

- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9652-9656
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**, 1159-1204
- Wissenbach, U., and Niemeyer, B. A. (2007). Trpv6. *Handb Exp Pharmacol*, 221-234
- Wollmuth, L. P., and Sakmann, B. (1998). Different mechanisms of Ca<sup>2+</sup> transport in NMDA and Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA glutamate receptor channels. *J Gen Physiol* **112**, 623-636
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P. S., Curtis, R., and Clapham, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**, 181-186
- Yamada, H., Wakamori, M., Hara, Y., Takahashi, Y., Konishi, K., Imoto, K., and Mori, Y. (2000). Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells. *Neurosci Lett* **285**, 111-4.
- Yeh, B. I., Sun, T. J., Lee, J. Z., Chen, H. H., and Huang, C. L. (2003). Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J Biol Chem* **278**, 51044-51052
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., and Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* **2**, 596-607
- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-645
- Zeng, F., Xu, S. Z., Jackson, P. K., McHugh, D., Kumar, B., Fountain, S. J., and Beech, D. J. (2004). Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *J Physiol* **559**, 739-750
- Zholos, A. V., and Bolton, T. B. (1994). G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum. *J Physiol* **478 (Pt 2)**, 195-202
- Zholos, A. V., and Bolton, T. B. (1996). A novel GTP-dependent mechanism of ileal muscarinic metabotropic channel desensitization. *Br J Pharmacol* **119**, 997-1012
- Zholos, A. V., and Bolton, T. B. (1997). Effects of protons on muscarinic receptor cationic current in single visceral smooth muscle cells. *Am J Physiol* **272**, G215-223

- Zholos, A. V., Zholos, A. A., and Bolton, T. B. (2004). G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol* **123**, 581-598
- Zhou, J., Du, W., Zhou, K., Tai, Y., Yao, H., Jia, Y., Ding, Y., and Wang, Y. (2008). Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* **11** (7), 741-743
- Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2003). The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* **333**, 965-975
- Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., and Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett* **373**, 193-198
- Zhu, X., Jiang, M., and Birnbaumer, L. (1998). Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 133-142
- Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996). Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* **85**, 661-671
- Zitt, C., Obukhov, A. G., Strübing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1997). Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *Journal of Cell Biology* **138**, 1333-1341
- Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A. G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1996). Cloning and functional expression of a human Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* **16**, 1189-1196

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
$\text{AlF}_4^-$	Aluminiumfluorid
Ank	Ankyrin-ähnliche Domäne
AS	Aminosäure
ASIC	<i>Acid Sensing Ion Channel</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
C	Kapazität
cADP-Ribose	zyklisches Adenosin-5'-Diphosphat-Ribose
$\text{Ca}_v$	spannungsgesteuerter Calciumkanal
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differenzialinterferenzkontrast
DNA	Deoxyribonucleinsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
$E_{\text{ion}}$	Nernst-Potential
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERG	Elektroretinogramm
f	Aktivitätskoeffizient
F	Faradaykonstante (96485,4 C/mol)
g, $\gamma$	Leitfähigkeit, Einzelkanalleitfähigkeit
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein koppelnder Rezeptor
$\text{GTP}\gamma\text{S}$	Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]-Triphosphat
$\text{H}^+$	Proton
H <sub>1</sub> R	Histaminrezeptor, Subtyp 1
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i> -Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I, i	Strom, Einzelkanalstrom
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50% Hemmung erzielt wird
IF	<i>Insert</i> -Fragment
IP <sub>3</sub> (R)	Inositol-1,4,5-Triphosphat (-Rezeptor)
Kap.	Kapitel
KcsA	K <sup>+</sup> -Kanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
K <sub>v</sub>	spannungsgesteuerter Kaliumkanal

MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
n	Anzahl der Experimente / Kanäle in der Membran
n.d.	nicht definiert
Na <sub>v</sub>	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NMDG <sup>+</sup>	N-Methyl-D-Glucamin
NO	Stickstoff-Monoxid
P	Permeabilität
PAM	Point Acception Mutation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
pIC <sub>50</sub>	negativer dekadischer Logarithmus von IC <sub>50</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
P <sub>o</sub>	Offenwahrscheinlichkeit
R	Widerstand, universelle Gaskonstante
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RyR	Ryanodinrezeptor
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarco-/Endoplasmatic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
STIM-1	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
t	Zeit
T	absolute Temperatur
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
τ	Zeitkonstante
TM	Transmembrandomäne
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
V	Spannung
VF	Vektorfragment
VNO	Vomeronasales Organ
wt	Wildtyp
X <sup>+</sup> , Y <sup>2+</sup>	monovalente, divalente Kationen
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z	Valenz, <i>Gating Charge</i>



## 9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Tim Plant für die hervorragende Betreuung der Arbeit bedanken. Er hat durch seine fachliche Kompetenz, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine guten Anregungen und Vorschläge und nicht zuletzt durch seine Geduld ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie, Ursula Storch, Janine Wäring und Dr. Michael Mederos y Schnitzler danke ich vor allem für das freundliche Miteinander im Labor. Frauke Kepura gebührt mein besonderer Dank für mehrfache kritische (und außerordentlich schnelle) Durchsicht des vorliegenden Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Eva Braun für ihre hervorragende technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Olaf Pinkenburg und Herrn Dr. Thomas Hofmann möchte ich dafür danken, dass sie mir bei molekularbiologischen Problemen zu jeder Tages- und Nachtzeit zur Hilfe waren.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für das sehr gute Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und für die vielen fruchtbaren (und auch die unfruchtbaren) Debatten bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, zum einen für die großzügige Bereitstellung von Räumen, Geräten und Materialien, die nicht direkt dem Bereich Elektrophysiologie zufielen, und zum anderen für die Übernahme der Kongressreisekosten.

Besonderer Dank gilt zu guter Letzt natürlich auch meiner Familie, allen voran meiner Freundin Diana Rothe, meiner Tochter Clara sowie Victoria, die meine Arbeit mit Liebe und Unterstützung begleitet haben.

## 10. Anhang

### 10.1. Eigene Publikationen

#### 10.1.1. Zeitschriftenbeiträge

**Semtner, M.**, Schaefer, M., Pinkenburg, O., and Plant, T. D. (2007). Potentiation of TRPC5 by protons. *J Biol Chem* **282**, 33868-33878

Strotmann, R., **Semtner, M.**, Kepura, F., Plant, T. D., and Schoneberg, T. Interdomain interactions control Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation in the cation channel TRPV4. *PLoS One* **5**, e10580

#### 10.1.2. Kongressbeiträge

**Semtner, M.**, Hellwig, N., Schaefer, M., and Tim T. D. (2006). Similarities in the modulation of TRPC5 and TRPV1 by extracellular cations. Postervortrag in Eilat, Israel beim Minerva-Gentner Symposium

**Semtner, M.**, Pinkenburg, O., Schaefer, M., and Plant, T. D. (2007). Protons activate and potentiate currents through TRPC5. Postervortrag in Mainz bei der Frühjahrstagung der DGPT.

### 10.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Elektrophysiologische Charakterisierung des klassischen TRP-Kanals TRPC5“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Prof. Dr. Tim D. Plant ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 10.3. Tabellarischer Lebenslauf

**Name:** Marcus Semtner

**Anschrift:**

**Telefon:** privat:  
mobil:

**Email:**

**Geburtsdatum:** 22.08.1979

**Geburtsort:** Sangerhausen

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:**

#### **Schulische Ausbildung**

---

1986-1991 POS Rossla  
1991-1998 Goethe-Gymnasium Kelbra

#### **Grundwehrdienst**

---

1998 PiBtl1, Holzminden  
1998-1999 PzAufklBtl, Augustdorf

#### **Studium**

---

1999-2004 Studium der Biochemie an der FU Berlin  
  
Vordiplom  
Diplom

#### **Doktorarbeit**

---

2004-2008 Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. T. D. Plant, Philipps-Universität Marburg

#### **Weitere Arbeitsstellen**

---

seit 2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neurophysiologie in der AG Grantyn, Charité Campus Mitte, Berlin

## 10.4. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

Abram, Ulrich  
Achazi, Rudolf K.  
Baumgärtel, Helmut  
Erdmann, Ralf  
Erdmann, Volker  
Fuhrhop, Jürgen-H.  
Hartl, Hans  
Heinemann, Udo  
Hucho, Ferdinand  
Kirchhoff, Frank  
Kirste, Burkhard  
Knapp, Ernst W.  
Kurreck, Jens  
Kyriakopoulos, Antonios  
Lüders, Klaus  
Luger, Peter  
Nöthel, Horst  
Oschkinat, Hartmut  
Plant, Tim D.  
Rewicki, Dieter  
Saenger, Wolfram  
Schlüter, A.-Dieter  
Schmitt, Jürgen  
Schuster, Wolfgang  
Schweiger, Manfred  
Seppelt, Konrad  
Simon, Jürgen  
Starke, Kai  
Steiner, Thomas  
Ulbrich, Norbert  
Weigend, Maximilian  
Weitzel, Karl-M.